



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

**“Regulación de los genes *sno* y *smad7*
por el correpresor transcripcional TGIF”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

BÁSICA

PRESENTA:

LAYLA ORTIZ GARCÍA

TUTORA:

DRA. MARINA MACÍAS SILVA

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el laboratorio 225N del Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto fue apoyado por el donativo IN222909 de PAPIIT/DGAPA/UNAM y por los donativos No. 49493 y No. 102726 del CONACyT.

“...Although there was a cloud hanging over my future, I found, to my surprise, that I was enjoying life in the present more than before, I began to make progress with my research...”

-S. Hawking

A mi papá.

A mi mamá.

A Eric.

A mi abuelita Vicha.

A Silvia.

A Rey, Charlie, Dany, Bety, Fer.

A mi abuelito Vicho.

In my life, I've loved them all.

Agradecimientos

A la Dra. Marina Macías Silva.

A la M. en C. Ángeles Concepción Tecalco Cruz.

A los miembros del jurado.

A la Bióloga Marcela Sosa Garrocho.

A los miembros del laboratorio 225N.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Índice

Abreviaturas	9
Resumen	12
Abstract	13
1. Introducción	14
1.1. Señalización celular	14
1.2. El Factor de Crecimiento Transformante-Beta (TGF- β)	15
1.3. Mecanismo de señalización del TGF- β	16
1.3.1. Activación de los Receptores del TGF- β	17
1.3.2. Activación de las proteínas Smad	18
1.4. Smad Inhibitoria (I-Smad ó Smad7)	19
1.5. Regulación Transcripcional	22
1.5.1. Activación	22
a) Coactivadores de las Smad	22
b) Desrepresión	23
1.5.2. Represión	23
a) Correpresores de las Smads	23
1.6. Familia de correpresores Ski: Ski y SnoN	25
1.6.1. Ski y SnoN como correpresores de la Vía del TGF- β	27
1.7. El correpresor TGIF	28
1.7.1. Estructura y función de TGIF	30
1.7.2. TGIF como correpresor de la Vía del TGF- β	33
1.7.3 TGIF y otras vías de señalización	35
1.8. Genes blanco del TGF- β	37
1.8.1. Los genes sno y smad7 son genes blanco del TGF- β .	37
2. Antecedentes	39
3. Planteamiento del problema	40
4. Hipótesis	41
5. Objetivos	41

5.1. Objetivo general	41
5.2. Objetivos particulares	42
6. Materiales y Métodos	42
6.1 Bioinformática	42
6.2. Cultivos celulares	43
6.3. Transfecciones celulares	43
6.4. Reactivos y anticuerpos	45
6.5. Ensayo de luciferasa	45
6.6. Extracción de proteínas totales	46
6.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	46
6.8. Western Blot	47
6.9. Extracción de RNA total	47
6.10. Ensayo de RT-PCR	48
6.11. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	49
6.11.1. Preparación de la cromatina	49
6.11.2. Inmunoprecipitación de la cromatina	50
6.11.3. Recuperación del DNA	50
6.11.4. PCR	51
6.12. ChIP en plásmido	52
7. Resultados	53
7.1. Bioinformática. Obtención de los sitios de unión a TGIF en las secuencias de los promotores sno y smad7	53
7.2. Efecto de TGF- β sobre la actividad de los promotores de sno y smad7	54
7.3. Efecto de la sobreexpresión de TGIF sobre los promotores de sno y smad7	56
7.4. El efecto de TGIF sobre el promotor de sno es dependiente de la dosis	57
7.5. Efecto de las mutantes de TGIF en la regulación transcripcional de sno y smad7	58
7.5.1. Evaluación de la sobreexpresión de las mutantes de TGIF	58

7.5.2. Efecto de la sobreexpresión de las mutantes de TGIF sobre la activación de los reporteros de sno y smad7	60
7.5.3 Efecto de las mutantes de TGIF sobre los niveles de RNAm de smad7 y sno	63
7.6. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	64
7.7. Resultados preliminares	66
ChIP en plásmido	66
8. Discusión	68
8.1. Análisis bioinformático. El sitio de unión a TGIF se encontró en los promotores de sno y smad7	68
8.2. Los promotores sno y smad7 son modulados por TGF-β	70
8.3 TGIF modula la represión del promotor de smad7 y la activación del promotor de sno a nivel basal	71
8.4. TGIF reprime la activación por TGF-β de sno y smad7	72
8.5. Las mutantes de TGIF. Mecanismo de regulación transcripcional de sno y smad7.	73
8.6. TGIF es reclutado a los promotores de sno y smad7 y se disocia en respuesta al TGF-β.	74
8.7. La sobreexpresión de TGIF impide el posicionamiento de Smad2/3 sobre los promotores de sno y smad7 en respuesta al TGF-β.	75
9. Conclusiones	75
10. Perspectivas	79
11. Apéndice	81
12. Referencias	86

Abreviaturas

Abreviatura	Significado en inglés	Significado en español
aa	Amino Acid	Aminoácido
AMH	Anti-Müllerian Hormone	Hormona Anti-Mulleriana
AMP	Adenosine Monophosphate	Adenosín monofosfato
APC	Anaphase-promoting Complex	Complejo Promotor de la Anafase o Ciclosoma
BMP	Bone Morphogenetic Protein	Proteína Morfogénica del Hueso
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	Adenosín monofosfato cíclico
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
CBP	CREB-Binding Protein	Proteína coactivadora de unión a CREB
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation	Inmunoprecipitación de cromatina
Co-Smad	Common-Partner Smad	Smad Común
CREB	cAMP-responsive Element Binding Protein	Proteína de unión al elemento responsivo a cAMP
CtBP	C-terminal Binding Protein	Proteína de unión al carboxilo terminal
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Medio Mínimo Esencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimetilsulfóxido
DNA	Desoxyribonucleic Acid	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates	Desoxinucleótidos Trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
ECL	Enhanced Chemiluminescence	Ensayo de Quimioluminiscencia
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Epidermal Growth Factor	Factor de crecimiento epidérmico.
FAST	Fork-Head Activin Signal Transducer	Un transductor de señales de las activinas
HD	Homeodomain	Homeodominio
HDAC	Histone deacetylase	Desacetilasa de histonas
HGF	Hepatocyte Growth Factor	Factor de Crecimiento de los Hepatocitos
HIPK2	Homeodomain Interacting Protein Kinase	Proteína cinasa de interacción con el homeodominio 2
HPE	Holoprosencephaly	Holoprocéfalo

HRP	Horseradish Peroxidase	Peroxidasa de rábano
I-Smad	Inhibitory Smad	Smad Inhibitoria
IP	Immunoprecipitation	Inmunoprecipitación
JNK	c-Jun N-terminal Kinase	Cinasa que une y fosforila a c-Jun
Kb	Kilobase	Kilobase
KDa	Kilodaltons	Kilodaltones
Lux	Luciferase	Luciferasa
LZ	Leucine Zipper	Cierre de Leucina
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	Cinasa activada por mitógenos
MeCP2	Methyl CpG-Binding Protein 2	Proteína de unión a DNA metilado 2
MH1	Mad Homology 1	Dominio homólogo a Mad 1
MH2	Mad Homology 2	Dominio homólogo a Mad 2
N-CoR	Nuclear Receptor Corepressor	Correpresor del Receptor Nuclear
pb	En inglés bp (base pairs)	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline	Solución de Buffer de Fosfatos
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	Polivinilideno fluoruro
R-Smad	Receptor activated Smad	Smad activada por receptor
RA	Retinoic Acid	Ácido Retinoico
RD	Repression Domain	Dominio de Represión
RNA	Ribonucleic Acid	Ácido Ribonucléico
RT	Reverse Transcription	Transcripción Reversa
RXR α	Retinoid X Receptor- α	Receptor X de ácido retinoico- α
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation	Proteína de anclaje para la activación de las Smads.
SBE	Smad Binding Element	Elemento de unión a las Smads
SIE	Smad Inhibitory Element	Elemento Inhibitorio de las Smads
Ski	Sloan-Kettering Institute protooncogene	Protooncogén del Instituto Sloan-Kettering (donde fue descubierto)
Smurf	Smad Ubiquitination-Related Factor	Factor relacionado con la ubiquitinación de las Smads (Ligasa de ubiquitina)
SnoN	Ski-related Novel Protein N	Proteína N nueva relacionada a Ski
T β RI	TGF- β Type I Receptor	Receptor de TGF- β Tipo I
T β RII	TGF- β Type II Receptor	Receptor de TGF- β Tipo II
TALE	Three Aminoacid Loop Extension	Extensión de 3 aminoácidos en loop.

TGF- β	Transforming Growth Factor- β	Factor de Crecimiento Transformante - β
TGIF	TG-Interacting Factor	Factor de interacción con TG.
TR	Tandem Repeats	Repeticiones en tándem (una detrás de otra)
TRE	TGF- β -Responsive Element	Elemento de respuesta al TGF- β
vol	Volume	Volumen

Resumen

Los genes *sno* y *smad7* son genes blanco del Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β) ya que son inducidos por la vía de señalización de las Smads. Sus promotores contienen Elementos de Unión a las Smads (SBEs) los cuales son requeridos para una regulación positiva de la vía TGF- β /Smads, sin embargo, poco se conoce acerca de su regulación negativa en la vía.

TGIF es una proteína que contiene un homeodominio de unión a DNA, la cual se ha demostrado que funciona como regulador negativo de la vía del TGF- β . El mecanismo por el cual TGIF participa en la inhibición de la señal del TGF- β ha sido atribuido principalmente a su habilidad de reclutar un complejo de represión transcripcional que contiene a las desacetilasas de histonas sobre Smad2.

Para determinar si TGIF tiene un efecto en la regulación transcripcional de los genes *sno* y *smad7* en la vía del TGF- β , se midió la actividad del reportero 3TPLux y de los promotores de los genes *smad7* y *sno*, los cuales fueron clonados en un vector con el reportero de luciferasa (pGL3) y transfectados de manera transitoria en diferentes líneas celulares junto con TGIF. Se encontró que TGIF reprime la actividad de los reporteros 3TPLux y *smad7* tanto a nivel basal como su expresión inducida por TGF- β . De manera contrastante, TGIF activa al promotor del gen *sno* a nivel basal pero inhibe su inducción por TGF- β , esto en las células AD293, HepG2 y C9. Además, la sobreexpresión de TGIF es capaz de causar una activación del promotor del gen *sno* de una manera dependiente de la concentración. Los ensayos de RT-PCR indican que TGIF es capaz de inducir un incremento en los niveles del mensajero de *sno*, y un decremento en los niveles del mensajero de *smad7*.

En conjunto, estos datos nos indican que TGIF participa en la represión del gen *smad7* pero no en la de *sno*, lo cual sugiere una regulación diferencial de estos genes por el correpressor transcripcional TGIF. En conclusión se obtuvo que en la regulación a nivel basal TGIF es capaz de reprimir a *smad7* y activar a *sno* mientras TGIF inhibe la transcripción dependiente del TGF- β en ambos casos.

Abstract

The *sno* and *smad7* genes are Transforming Growth Factor- β (TGF- β) targets induced by Smad signaling, their promoters contain Smad-binding elements (SBEs) required for a positive regulation by the TGF- β /Smad pathway, however, little is known about their negative modulation in the pathway.

TGIF is a DNA-binding homeodomain protein that has been demonstrated to function as an important negative regulator in the TGF- β Pathway. The mechanism of TGIF-mediated inhibition of TGF- β signaling has been primarily attributed to its ability to recruit a transcriptional repressor complex that contains histone deacetylases to Smad2.

To determine whether TGIF has an effect on the transcriptional regulation of *sno* and *smad7* genes via TGF- β , we measured luciferase activity of the 3TPLux reporter, and of the *smad7* and *sno* gene promoters that were cloned in a luciferase reporter vector (pGL3), which were transfected transiently in different cell lines along with TGIF. We found that TGIF repressed the activity of both *smad7* and 3TPLux reporters, both basal and TGF- β induced expression. In contrast, TGIF activated *sno* gene promoter in a basal level and repressed its TGF- β induced expression in AD293, HepG2 and C9 cell lines. TGIF overexpression is also able to cause a dose-dependent activation of *sno* gene promoter. Reverse-transcription PCR assays indicate that TGIF is able to induce an increase in the level of *sno* mRNA and a decrease in the level of *smad7* mRNA.

Taken together, these data indicate that TGIF is involved in the repression of the *smad7* gene, but not of the *sno* gene, suggesting a differential regulation of these genes by Smad corepressor, TGIF. The conclusion of this work is that TGIF is capable of causing a repression of *smad7* and an activation of *sno* at a basal level, however, TGIF inhibits the transcription activated by TGF- β in both cases.

1. Introducción

1.1. Señalización celular

En un organismo multicelular, cada célula debe tener la capacidad de comunicarse con otra y responder a un conjunto de señales del exterior para poder gobernar su propio comportamiento y lograr el beneficio del organismo como un todo.

Estos mecanismos de comunicación dependen de moléculas de señalización extracelular, las cuales son producidas en unas células para mandar mensajes a otras. También dependen de los sistemas particulares de proteínas que cada célula contenga y que le permitan responder a la presencia de las moléculas de señalización en una forma específica. Estas proteínas incluyen a los receptores de membrana, que unen a la molécula de señalización y, a una variedad de proteínas de señalización intracelular que se encargarán de distribuir la señal a las partes apropiadas de la célula, entre éstas encontramos a las cinasas, fosfatasa, y muchas otras que a su vez van a interactuar con estas proteínas. Y, finalmente, existen proteínas blanco, las cuales son alteradas cuando una vía está activa lo cual cambiará el comportamiento de la célula. Dependiendo del efecto de la señal, estas proteínas blanco pueden ser proteínas reguladoras de genes, canales iónicos, componentes de una vía metabólica, componentes del citoesqueleto, etcétera (Alberts, et. al., 2002) (Figura 1).

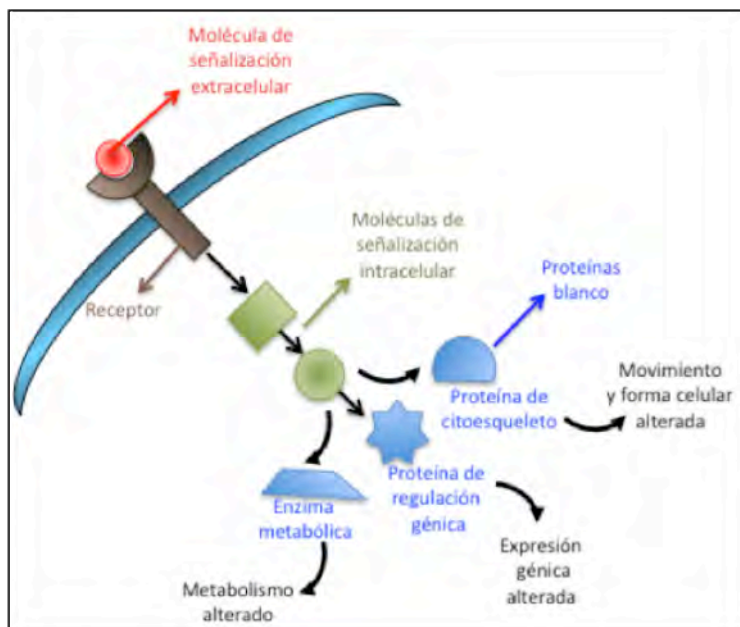


Figura 1. Vía de señalización sencilla activada por una molécula extracelular.

La molécula de señalización extracelular se une a una proteína receptora (embebida a la membrana plasmática), activando una vía interna que es mediada por una serie de proteínas de señalización una o más de estas proteínas interactúa con una proteína blanco, alterándola de manera que ayude a cambiar el comportamiento de la célula. (Modificada de Alberts et.al., *Molecular Biology of the Cell*, 4ta. edición, 2002).

1.2. El Factor de Crecimiento Transformante-Beta (TGF- β)

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β ; Transforming Growth Factor-beta) consiste de un amplio número de proteínas diméricas (alrededor de 40) que están estructuralmente relacionadas, las cuales, al ser secretadas pueden actuar como hormonas o bien, como mediadores locales regulando una amplia gama de funciones biológicas en todos los animales (Alberts, et. al., 2002).

Estas citocinas han sido identificadas en una variedad de organismos vertebrados e invertebrados, la superfamilia incluye a la familia del TGF- β en *stricto sensu*, que cuenta con 5 miembros, el TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 identificados en mamíferos y el TGF- β 4 y TGF- β 5 identificados en aves y en *Xenopus* respectivamente, además incluye a la familia de las activinas e inhibinas, a las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs; bone morphogenetic proteins), a la hormona anti-mulleriana (AMH) y a la miostatina, entre otras (Cui et. al., 1996, Javelaud, et. al., 2004).

El TGF- β es el miembro prototipo de esta gran familia, siendo una citocina ubicua con efectos muy variados, debido a esto, su síntesis, su activación y su cascada de señalización tienen una estricta regulación. Participa en aspectos fundamentales de la conducta celular como la inhibición de la proliferación en distintos tipos celulares, también, puede inducir la diferenciación dependiendo de la célula blanco y de su entorno, puede inducir apoptosis en algunos tipos celulares, y participa en la migración, adhesión, modificación del microambiente celular, etc. (Massagué, 1990; Massagué, et. al., 2006).

Además, el TGF- β se ha visto implicado en distintas respuestas fisiológicas como por ejemplo, la modulación del sistema inmune ya que funciona como inmunosupresor, y la modulación de la respuesta inflamatoria (Wrana et. al., 1992; Massagué, 1998; Siegel, et. al., 2003).

Es importante mencionar también su papel fisiológico en el cáncer, se sabe que su participación en este proceso tan complejo es dual, es decir, participa en el proceso de supresión tumoral pero también puede promover la generación y crecimiento de los tumores. La capacidad que tiene el TGF- β de inhibir la proliferación de células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas y del sistema inmune es central para su función como supresor de tumores la cual predomina en los tejidos normales. Por el contrario, en procesos tumorigénicos los cambios en la expresión de la citocina en

el microambiente y los cambios en las respuestas celulares favorecen su actividad oncogénica (Miyazono, et.al., 1994; Wakefield, et. al., 2002).

Una característica de algunos tipos de cáncer es la falta de respuesta de las células a la acción antiproliferativa o citostática de la citocina, esto puede ser debido a la pérdida genética o epigenética de los componentes de la vía, ya sea por mutaciones en los receptores, en las proteínas de señalización interna de la vía o cambios en su expresión o bien, puede ser por alteraciones en otras vías de señalización que afecten indirectamente la señalización del TGF- β , como por ejemplo en el cáncer de colon cuya vía esta alterada por mutaciones en el receptor tipo II (T β RII) o el cáncer pancreático donde la proteína Smad4 está mutada (Maurice, et. al., 2001; Yingling, et.al., 2004).

El papel del TGF- β cambia de supresor a oncogen cuando el tumor progresa, esto ocurre gracias a la capacidad de la citocina de convertir tumores epiteliales tempranos en invasivos y metastáticos, a través de un mecanismo conocido como transición epitelio-mesénquima durante el cual ocurre una transdiferenciación celular en la que se incrementa la plasticidad celular y las células pueden separarse del tumor primario para llegar al flujo sanguíneo. Además, las células malignas secretan TGF- β que, como ya se mencionó puede actuar en el organismo como inmunosupresor (en este caso supresor de las respuestas antitumorales), así como estimulador de la producción de matriz extracelular y como potenciador de la angiogénesis. También participa en el desarrollo temprano, en donde sus funciones podrían ser similares a las de los estados tumorales avanzados, ya que la naturaleza de estas células tumorales se asemeja a un tipo celular no diferenciado (Yingling, et.al., 2004).

1.3. Mecanismo de señalización del TGF- β

El sistema de transducción canónico del TGF- β incluye a una familia de receptores de membrana con actividad de cinasas de residuos de serinas y treoninas, y una familia de sustratos de los receptores llamadas proteínas Smad, que actúan como factores de transcripción. De manera general, el ligando se une a su receptor y este complejo activa a las Smad, posteriormente, las Smad forman complejos que van al núcleo para regular la transcripción de sus genes blanco (Wrana, et. al., 1992; Massagué, 1998) (Figura 2).

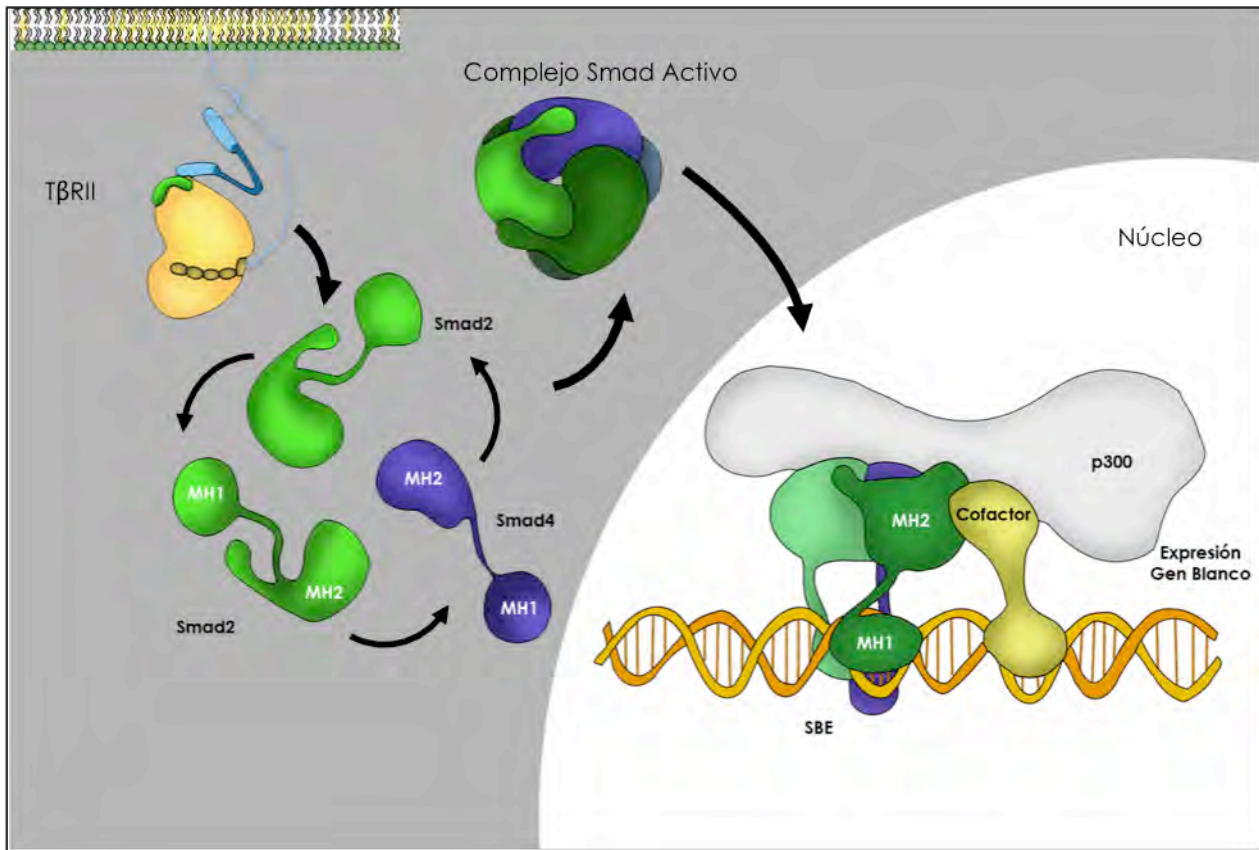


Figura 2. Vía de señalización canónica del TGF- β dependiente de las Smad. En el espacio extracelular el ligando dimérico se une al receptor tipo II (T β RII), el cual induce la transfosforilación del receptor tipo I (T β RI). El T β RI activado es capaz de activar a las R-Smad (Smad2 y 3), proteínas que a su vez forman complejos heterotriméricos con la Co-Smad (Smad4). Los complejos activos se translocan al núcleo donde regulan la transcripción de genes blancos mediante interacción física con el DNA en sus secuencias de unión a Smads (SBEs). Las Smads regulan positiva o negativamente la expresión de sus genes blanco dependiendo de su asociación con factores de transcripción, coactivadores o correpresores. (Modificada de Gomperts et. al., *Signal Transduction 2nd edition*, 2009).

1.3.1. Activación de los Receptores del TGF- β

Los ligandos de la familia del TGF- β se unen a un complejo de receptores transmembranales, el cual está formado por un heterodímero en el que participan dos proteínas distintas conocidas como receptor tipo I (T β RI) y receptor tipo II (T β RII) las cuales tienen un dominio intracelular con actividad de cinasa de residuos de serinas y treoninas. De hecho, todos los receptores con actividad

de cinasa de residuos de serinas y treoninas se han identificado como miembros de la familia de receptores del TGF- β (Lin, et. al., 1992; Lewin, 2004).

El ligando se une al receptor T β RII creando un complejo ligando-receptor que tiene una gran afinidad por el receptor T β RI, reclutándolo al complejo, lo cual forma un complejo tetramérico en el que el receptor T β RII transfosforila al T β RI en una región intracelular rica en glicinas y serinas llamada dominio GS, lo cual genera un cambio conformacional que activa la cinasa del T β RI. Una vez que se forma el complejo activado, el receptor Tipo I fosforila a sus sustratos intracelulares, particularmente a los miembros de la familia de las R-Smad citosólicas (Wrana, et. al., 2004; Macías-Silva, et. al., 1996; Zhu, et. al., 2001; Lewin, 2004).

1.3.2. Activación de las proteínas Smad

Las proteínas Smad son una familia de factores de transcripción que se han encontrado en vertebrados, insectos y nemátodos. Fueron los primeros sustratos identificados del T β RI, y son los únicos a los que se les ha demostrado su función principal, que es la habilidad de propagar la señal del TGF- β a los genes blanco en el núcleo (Massagué, et. al., 2000).

Existen 9 proteínas Smad las cuales se clasifican en 3 grupos funcionales: Las Smad reguladas por receptor (R-Smads) son las activadas específicamente por los receptores, a este grupo pertenecen la Smad2 y 3 mediadoras de la vía del TGF- β y de las activinas, la Smad1, 5 y 8 que son activadas por la vía de las BMPs. En el segundo grupo encontramos a la Smad4 o Smad común o cooperadora (Co-Smads) que actúa como pareja universal de las R-Smads ya puede formar dímeros con todas las R-Smad específicas de cada vía, finalmente, en el tercer grupo están las Smad Inhibitorias (I-Smads) que actúan como competidores inhibitorios de la vía, dándole otro nivel de complejidad y regulación a la vía de señalización, a este grupo pertenecen las Smad6 y 7 (Lewin, 2004). Para entender cómo se logra la activación de las proteínas Smad es importante explicar antes las características estructurales que poseen. De manera general, las Smad tienen dos dominios conservados que forman estructuras globulares separadas por una región rica en prolinas llamada "linker" que es de secuencia y longitud variable. El primer dominio MH1 (Mad Homology 1) que tiene capacidad de unión con el DNA se encuentra en el amino terminal mientras que el segundo, llamado MH2 (Mad Homology 2) está en el carboxilo terminal y participa en la translocación de la proteína al núcleo y tiene, además, capacidad de regular la transcripción. Ambos dominios son

regiones muy conservadas en todas las Smad, con excepción de las I-Smad cuyo extremo amino es un MH1 truncado (Massagué, et. al., 2000) (Figura 3).

Las R-Smad, Smad2 y 3 son activadas por una fosforilación mediada por el T β RI en su motivo SSXS en el carboxilo terminal lo que causa un cambio conformacional que lleva a la separación de los dominios MH1 y MH2 de una interacción mutuamente inhibitoria. Esto provoca la activación de las R-Smad y su acumulación en el núcleo. En su ruta hacia el núcleo las R-Smad se asocian con un segundo grupo, las Co-Smads. Éstas tienen una estructura MH1-linker-MH2 pero carecen de la secuencia SSXS y por lo tanto no son fosforiladas por el receptor. Se sabe que la interacción entre R-Smad y Co-Smad está mediada principalmente por contacto de sus dominios MH2. El heterodímero que se forma es importado al núcleo donde se une a secuencias específicas en el DNA y puede modular la transcripción al interactuar con cofactores de la transcripción (Massagué, et. al., 2000). Es importante mencionar que cada uno de los ligandos de la superfamilia del TGF- β activa a un receptor específico que a su vez señala por medio de una combinación particular de Smads, y, como ya se mencionó, existen otras muchas proteínas que pueden unirse a los dímeros de Smads y tienen influencia en su capacidad de actuar en la transcripción (Lewin, 2004).

1.4. Smad Inhibitoria (I-Smad ó Smad7)

Además de los correpresores, existe otra manera en que se presenta la regulación negativa de la vía, esta es mediante represores directos como es el caso de la Smad Inhibitoria o Smad7. La Smad Inhibitoria (I-Smad) Smad7 actúa como inhibidor de la vía, su gen *smad7* es un blanco directo del TGF- β por lo que la misma vía induce su expresión para lograr una asa de retroalimentación negativa, también puede ser inducido por otros estímulos extracelulares como son los factores de crecimiento o el estrés. La Smad7 puede unirse al sitio catalítico del T β RI y logra inhibir su actividad de cinasa, impidiendo la fosforilación y activación de las R-Smads evitando así la transcripción de los genes blanco de la vía (Hayashi, et. al., 1997; Nakao, et. al., 1997; Briones-Orta M. A., et. al. 2006).

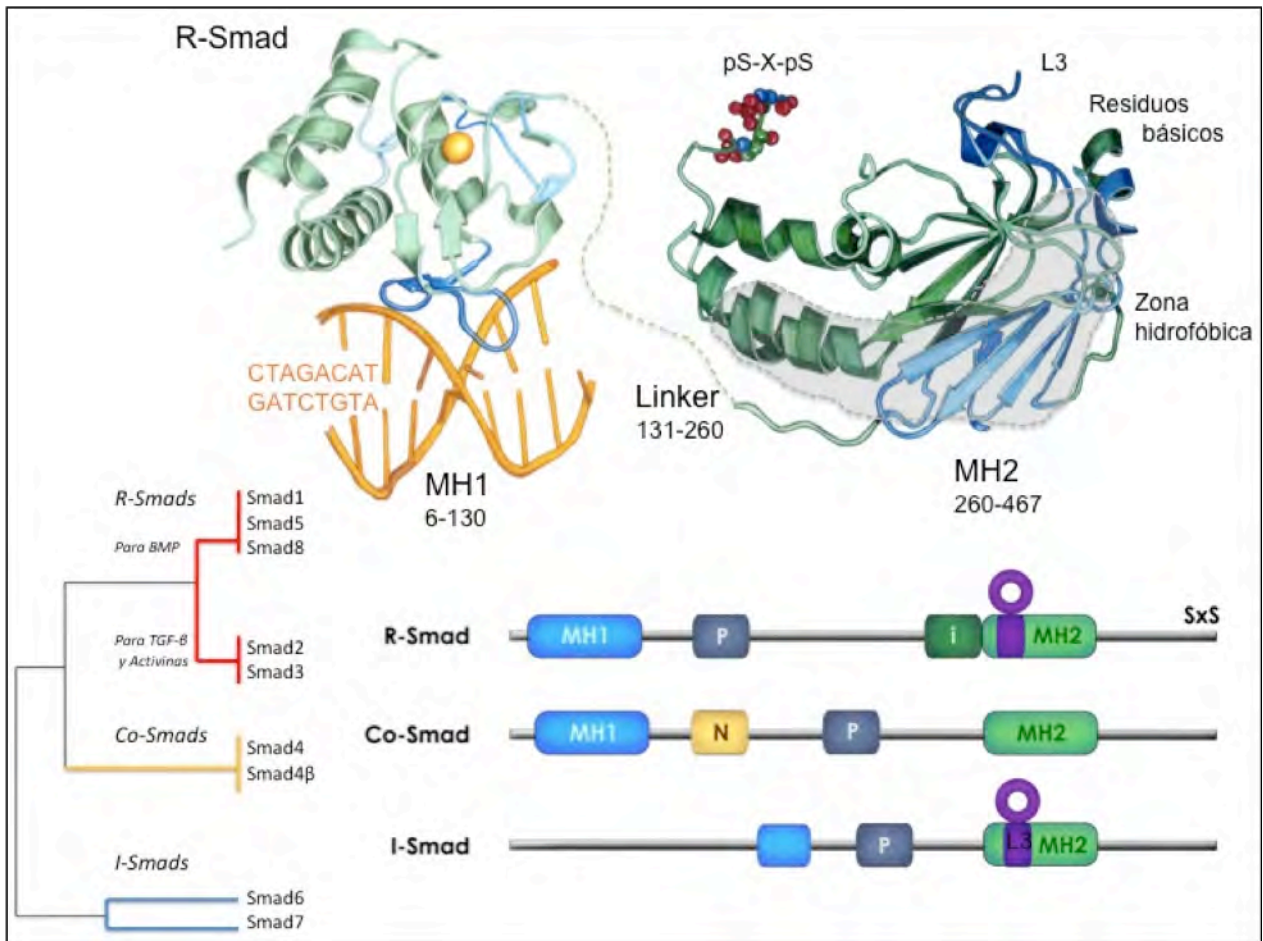


Figura 3. La familia de proteínas Smad. Diagrama que muestra la similitud de secuencia entre las 3 subfamilias de Smads. Las R-Smads (reguladas por receptor), y sus Smad cooperadoras o comunes (Co-Smads) contienen dos dominios conservados, el MH1 en el amino terminal (azul) y el MH2 en el carboxilo (verde), ambos separados por una región divergente llamada “linker”. Sólo el dominio MH2 es conservado en las I-Smads. En el diagrama superior se muestra la estructura de una R-Smad, la esfera amarilla representa el Zn^{2+} que estabiliza al MH1, en color azul se muestra el β -hairpin que une al SBE. El dominio MH2 se muestra la región pS-X-pS que es fosforilada por el receptor, además su loop L3 (en azul y en morado abajo) que interactúa con el dominio GS fosforilado del receptor. El corredor hidrofóbico (región sombreada gris) es el sitio de unión de diversas proteínas. En el diagrama inferior se muestra además la región de exportación nuclear en amarillo, la región NUP representada con una “i” y con una “P” el motivo PPxY con el cual interactúan con Smurf. (Modificada de Massagué y Wotton, *Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system*, The Embo Journal, 2000).

Esta proteína también puede reclutar a 2 ligasas de ubiquitina Smurf2 (Smad Ubiquitination-Related Factor 2) y APC (Anaphase-Promoting Complex) lo que promueve la ubiquitinación y degradación por la vía del proteasoma de las Smads activas. Smad7 funciona como un adaptador que permite el reclutamiento de las Smurfs al complejo de receptores, lo que causa la degradación de los receptores tipo I y II apagando la señal del TGF- β (Izzi, et. al., 2004). El gen *smad7* fue identificado con base a su similitud con las otras Smads, el papel de su proteína Smad7 fue dilucidado por medio de experimentos con genes reporteros, en los que se observó que tiene un papel negativo en la vía del TGF- β (Hayashi, et. al., 1997; Nakao, et. al., 1997). Análisis del perfil de expresión de Smad7 reveló que los niveles de mensajero aumentan en células tratadas con TGF- β , lo que sugiere que la proteína forma parte de una asa de retroalimentación negativa que apaga la señal del TGF- β y además se encontró, que su promotor es blanco de las proteínas Smads activas (Nagarajan, et. al. 1999; Nakao, et. al. 1997).

Debido a la importancia de esta proteína como reguladora de la vía del TGF- β , es de esperarse que esté implicada en distintas patologías, un ejemplo muy claro es el caso de las células epiteliales donde los niveles de Smad7 son bajos y sufren un aumento cuando se presentan diferentes tipos de cáncer (Nakao, et. al. 2002; Monteleone, et. al. 2001; Kleeff, et. al. 1999; Liu, et. al., 2003; Halder, et. al., 2005; Kuang, et. al., 2006) o bien, pueden presentarse mutaciones en Smad7 que están también asociadas a este tipo de padecimientos (Fukushima, et. al., 1993; Wang, et. al., 2000). A la proteína Smad7 también se le ha visto involucrada en la Enfermedad de Crohn, en la que se encuentra expresada en exceso lo que resulta en la inhibición de la vía del TGF- β (Monteleone et. al. 2001). Por el contrario, en un padecimiento llamado escleroderma, la Smad7 no se expresa eficientemente, lo que causa un potenciamiento de los efectos del TGF- β que llevan a alteraciones en las proteínas de matriz extracelular (Dong, et. al. 2002). La importancia fisiológica de Smad7 se ha establecido gracias a modelos con animales y estudios en pacientes, en los que mediante la regulación negativa de los niveles de Smad7 por medio de oligonucleótidos antisentido o RNA de interferencia se inhibe la respuesta proinflamatoria y fibrótica (Monteleone, et. al. 2001; Nakao, et. al., 1999; Dooley, et. al., 2003).

1.5. Regulación Transcripcional

Las proteínas Smads son factores de transcripción y por tanto pueden regular la transcripción de genes dependientes del TGF- β tanto positiva como negativamente (Siegel, et. al., 2003). Las Smads pueden formar distintos complejos que tienen una composición y una geometría específica al asociarse con diferentes parejas que se unen al DNA, alcanzando distintos niveles de afinidad y formando interacciones selectivas con el mismo fragmento de DNA. Entonces la combinación específica de Smads determina la región de DNA que será reconocida y si se reclutarán co-activadores o co-represores transcripcionales. Esto es porque la afinidad de las Smads por el DNA es baja y requieren de otros factores para unirse fuertemente a los promotores de los genes responsivos. La disponibilidad de estos co-factores depende del tipo y contexto celular lo que determina e gran parte la amplia gama de respuestas generadas por el TGF- β en cada célula (Massagué, et. al., 2000). Lo anterior se puede observar en los promotores de los diferentes genes que se regulan por el TGF- β , donde la secuencia palindrómica GTCT y AGAC que forma al SBE se repite varias veces, por ejemplo en los promotores de colágena I, c-Jun, IgA y Jun B, entre otros, y estas repeticiones pueden unir a los complejos de Smads y conferir a un gen heterólogo una inducción transcripcional por el TGF- β (Jonk, et. al. 1998; Zhang, et. al., 1998; Hanai, et. al., 1999; Hua, et. al., 1999).

1.5.1. Activación

a) Coactivadores de las Smad

La regulación positiva de esta vía de señalización es importante tanto para la amplificación de la señal como para que se tenga una respuesta celular al estímulo específico. Cabe mencionar que el TGF- β puede inducir la expresión de su propio gen, y también las Smads son moduladas positivamente por el mismo TGF- β (al ser activadas por el receptor después de la unión del ligando). Para lograr una activación o regulación positiva de los genes blanco del TGF- β se ha comprobado que existen distintos mecanismos, uno de ellos implica a la capacidad de las R-Smads y de la Smad4 de activar la transcripción, función que reside principalmente en su dominio MH2 (Massagué, 1998). El mecanismo por el cual las Smads se unen al DNA se da a través de la

cooperación con otros factores de transcripción, cuyos sitios de unión están aledaños al elemento SBE y parecen ayudar a estabilizar la interacción de las Smads a una secuencia específica del DNA (Seoane, et. al. 2004). Las proteínas Smad pueden interaccionar con un gran número de proteínas para modular la actividad transcripcional de los genes blanco del TGF- β , como ejemplos específicos de genes regulados por las Smad se tienen a los genes *mix2*, *goosecoid* y *p21ip*, entre muchos otros. El gen *mix2* muestra la necesidad de un factor adicional (Fast-1) para que la unión de las Smads a su promotor pueda llevarse a cabo (Chen, et. al., 1997). El gen *goosecoid* requiere de un complejo formado por Fast-2/Smad2/Smad4 para que se lleve a cabo la activación transcripcional del gen, sin embargo, si se encuentra Smad3 en el complejo en lugar de Smad2 no habrá activación sino que el gen permanecerá inactivo (Labbe, et. al. 1998). En el promotor del gen *p21ip* se encontró otro ejemplo de la interacción de las Smads con otros factores de transcripción, este promotor contiene un SBE y río arriba un elemento de unión a “forkhead” (FHBE) donde pueden interaccionar los factores FoxO1, FoxO3 y FoxO4, para ayudar a reclutar a Smad3 y así inducir la transcripción (Seoane, et. al. 2004).

b) Desrepresión

Se ha propuesto que las proteínas Smad activan la transcripción al contrarrestar la acción de los represores transcripcionales que están actuando sobre un gen blanco del TGF- β en condiciones basales. Un ejemplo de este mecanismo es el de los miembros de la familia de proteínas con homeodominio Hox, que reprimen la transcripción cuando están unidas al DNA, sin embargo, al interactuar con complejos Smad activados por BMP este efecto de represión se ve revertido. Así, se han encontrado varias proteínas que tienen sitios de unión a DNA además de su homeodominio y sitios de unión a las Smad. Muchos de estos mecanismos no han sido dilucidados totalmente (Massagué, et. al., 2000).

1.5.2. Represión

a) Correpresores de las Smads

Si bien existen mecanismos reguladores para inhibir la vía antes de que los complejos Smad activados lleguen al núcleo (que veremos más adelante), la existencia de correpresores transcripcionales representa un nivel de regulación muy importante y delicado para lograr una

represión de los genes blanco. Se ha comprobado que las Smads tienen la capacidad de reclutar a componentes de la maquinaria de represión es decir, corepresores con capacidad de reclutar a desacetilasas de histonas (HDACs; Histone Deacetylases) y por lo tanto reprimir la transcripción al condensar ciertas regiones en el DNA (Wotton, et. al., 1999; Luo, 2004) (Figura 4). Hasta la fecha son 3 los correpresores transcripcionales que se han identificado y de los que se hablará con más detalle a continuación: La proteína **Ski**, la proteína de homeodominio **TGIF** y la protooncoproteína **SnoN** siendo las dos últimas las proteínas de nuestro interés (Wotton, et. al., 1999).

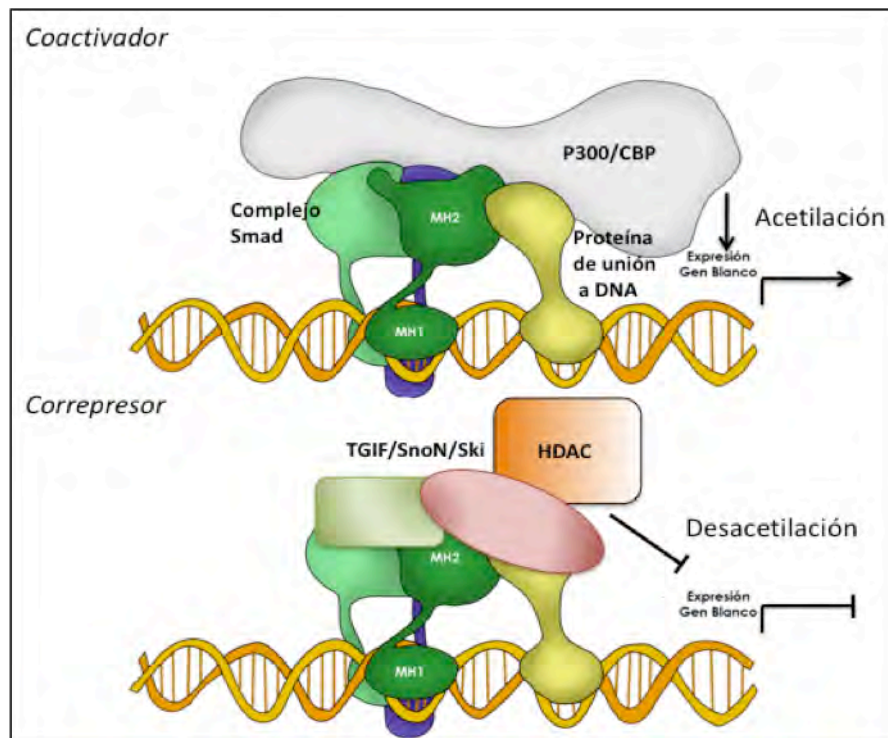


Fig. 4. Regulación transcripcional por reclutamiento de coactivadores o correpresores. Los activadores transcripcionales (p300 y CBP) inducen la acetilación de histonas activando así la transcripción. Los correpresores transcripcionales (TGIF, SnoN, Ski) reclutan directa o indirectamente a las HDACs y reprimen la transcripción al desacetilar a las histonas (Modificada de Miyazono, 2000).

1.6. Familia de correpresores Ski: Ski y SnoN

Los correpresores nucleares Ski y SnoN tienen un papel muy importante en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular, son expresados de forma ubicua virtualmente en todos los tejidos adultos además de los embrionarios, pero siempre a bajos niveles.

El primer miembro de esta familia es **ski** (Sloan-Kettering Institute Proto-oncogene) el cual fue descubierto como el oncogen presente en el retrovirus aviario "Sloan-Kettering" capaz de inducir la transformación oncogénica de las células embrionarias de pollo causando además una diferenciación miogénica. Aunque esta función paradójica aún no es comprendida en su totalidad, mucho se sabe sobre la biología molecular de la proteína Ski. El gen *v-ski* surge de una delección del homólogo celular de *c-ski*, una proteína nuclear de 728 aminoácidos y no presenta "splicing" alternativo. El homólogo de *c-ski* ha sido identificado en humano, ratón, pollo, *Xenopus* y pez cebra, su sobreexpresión puede también inducir una transformación morfológica y un crecimiento independiente del anclaje de los fibroblastos como se ha visto en embriones de pollo. Análisis por delección han indicado que su habilidad de causar transformación e inducir diferenciación puede ser atribuida en gran parte a la porción amino terminal de la proteína; por experimentos de "knock-out" genético se sabe que tiene efectos en el desarrollo temprano, en el desarrollo del músculo esquelético y en el sistema nervioso central, lo que indica que Ski tiene una participación importante durante la diferenciación (Liu, et. al., 2001).

El gen **sno** (ski-related novel gene) es otro miembro de esta familia de correpresores *ski* y se encontró al llevar a cabo hibridaciones de baja astringencia de *v-ski* con bibliotecas de cDNA humano. Al igual que *ski*, ha sido encontrado en todas las especies de mamífero que han sido probadas, así como en pollo y *Xenopus*; en pollo se ha encontrado sólo una forma de *sno* (SnoN) mientras que en el humano hay varias isoformas generadas por "splicing" alternativo designadas como SnoA (415 aminoácidos), SnoN (684 aminoácidos), SnoN2 (638 aminoácidos) y SnoI (399 aminoácidos), siendo SnoN el más abundante (Pearson-White, et. al., 1997).

Las diversas isoformas comparten una gran región homóloga a Ski de aproximadamente 270 aminoácidos en su región amino terminal y es aquí donde se encuentra su capacidad de causar la transformación celular. Sus extremos carboxilos presentan menor homología pero tienen dos dominios altamente conservados, un α -hélice que tiene 5 repeticiones en *tandem* imperfectas de

25 aminoácidos cada una (TR; tandem repeats) y un cierre de leucina que forma una α -hélice (LZ; leucine zipper). Se ha demostrado que la región carboxilo terminal es la mediadora de la homo y heterodimerización de Ski y Sno (Figura 5). La proteína SnoN es también una proteína nuclear que puede también transformar a los fibroblastos del embrión de pollo pero requiere de un nivel de expresión mucho más alto para poder lograrlo (Luo K., 2004). Por estudios de “knock-out” genético se ha dilucidado un poco la participación de SnoN en el desarrollo temprano y en la tumorigénesis. En ratones que carecen de *sno* se impide la formación del blastocisto y en ratones con *sno* en condiciones heterocigotas se aprecia una hipersensibilidad a los carcinógenos químicos y se ve que son propensos a desarrollar linfomas espontáneos. Esto sugiere que *sno* puede actuar como supresor de tumores y no como oncogen en algunas células y bajo ciertas condiciones. Se sabe también que un aumento en la expresión de *sno* puede transformar a los fibroblastos mientras que una disminución puede hacer a las células susceptibles a transformarse. Estas alternativas en su función aún no han sido dilucidadas en su totalidad (Liu, et. al., 2001).

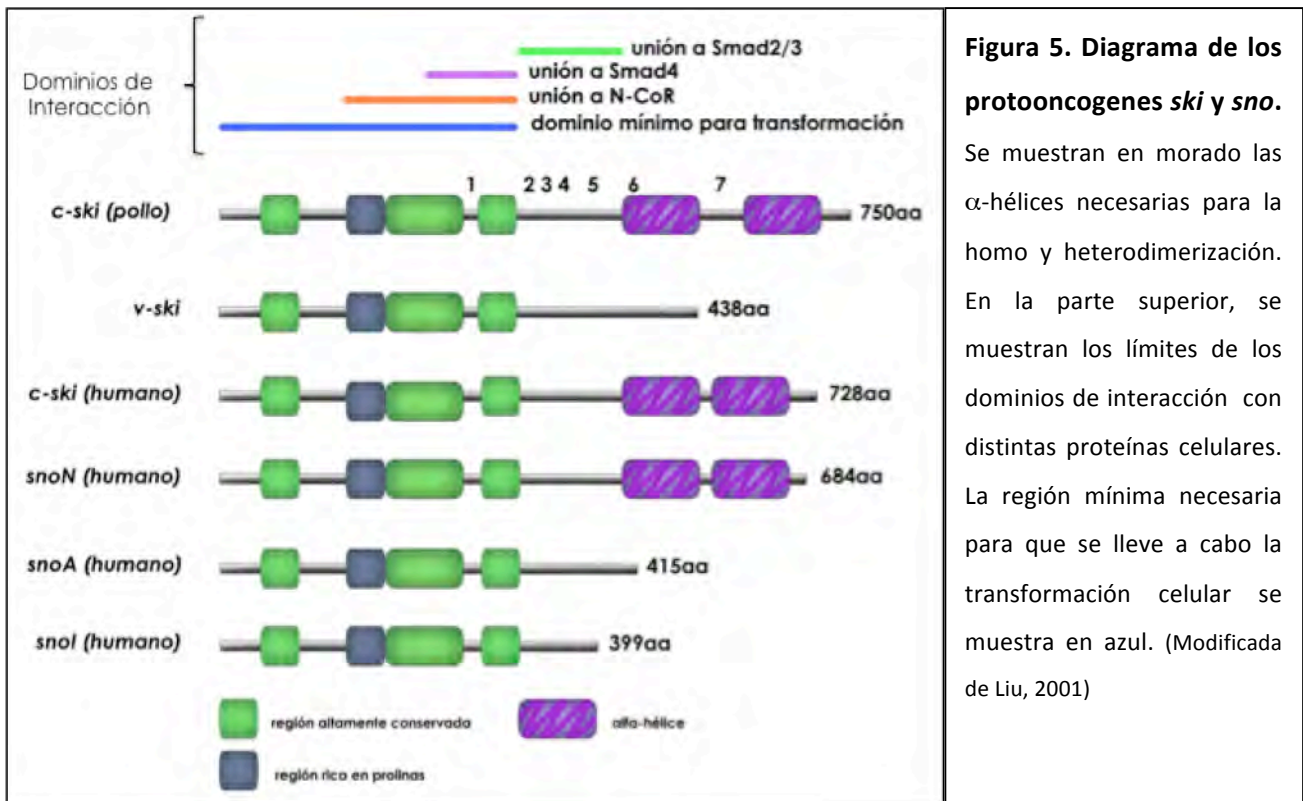


Figura 5. Diagrama de los protooncogenes *ski* y *sno*.

Se muestran en morado las α -hélices necesarias para la homo y heterodimerización. En la parte superior, se muestran los límites de los dominios de interacción con distintas proteínas celulares. La región mínima necesaria para que se lleve a cabo la transformación celular se muestra en azul. (Modificada de Liu, 2001)

1.6.1. Ski y SnoN como correpresores de la Vía del TGF- β

Los correpresores Ski y SnoN no tienen actividad catalítica intrínseca por lo que su función se debe principalmente a las interacciones que establecen con otras proteínas. Ski y SnoN pueden interactuar con Smad2, 3 y 4 y ser así reclutados a los elementos de unión a Smads llamados SBEs (SBE; Smad Binding Element) presentes en el DNA que corresponden a una secuencia consenso 5'-GTCTAGAC-3' que se encuentra en la mayoría de los genes responsivos a TGF- β . Se han delimitado además las regiones de Ski y SnoN que se unen a las Smads por medio de delecciones y del uso de proteínas quiméricas y se determinó que esta unión de los correpresores al DNA mediante las Smads lleva a la represión transcripcional (Ueki, et. al., 2003) (Figura 5). Ski y SnoN ejercen sus mecanismos de represión mediante el reclutamiento de complejos de correpresores transcripcionales como N-CoR (correpressor del receptor nuclear a hormonas), SMRT, mSin3A, HIPK2, MeCP2 (proteína de unión a CpG metiladas) y desacetilasas de histonas (HDACs). Al unirse a las Smads, Ski y SnoN pueden reclutar a este complejo de represores transcripcionales hacia los promotores de los genes blanco del TGF- β y reprimir así su transcripción. Sin embargo también se sabe que el reclutamiento de esta maquinaria de represión impide la unión de coactivadores transcripcionales como p300, CBP, etc., que normalmente se unen a los complejos activos de Smads permitiendo la expresión de dichos genes blanco del TGF- β (Luo, et. al., 1999; Stroschein, et. al., 1999) (Figura 6).

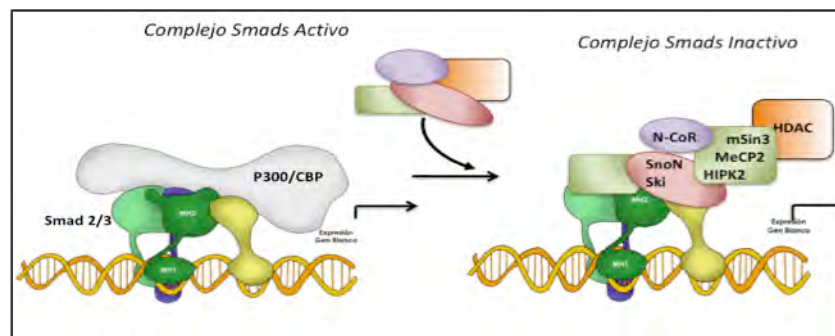


Figura 6. Mecanismo de represión de las proteínas Smad por Ski y Sno. Se muestran las desacetilasas de histonas (HDACs) y otros miembros de la maquinaria de represión transcripcional (N-CoR, mSin3, MeCP2, HIPK2) así como de la maquinaria activación (p300/CBP) (Modificada de Luo, 2004).

También han sido reportados mecanismos independientes de las HDACs, por ejemplo, la capacidad de Ski de impedir la interacción entre Smad4 y las R-Smads, ya que Ski presenta un dominio de unión a Smad4 el cual empalma con la superficie requerida para la unión del extremo carboxilo terminal fosforilado de las R-Smads, impidiendo así la formación de complejos transcripcionalmente activos. Se ha sugerido también que Ski aumenta la estabilidad de los complejos Smad inactivos sobre los SBEs impidiendo así la llegada al sitio de complejos activos (Suzuki, et. al., 2004; Wu, et. al., 2002).

1.7. El correpresor TGIF

TGIF (TGIF; TG-interacting Factor) es una proteína nuclear que se expresa de manera ubicua y que forma parte de la familia de proteínas con homeodominio (HD; Homeodomain). El HD es una estructura formada por aproximadamente 60 aminoácidos acomodados en 3 α -hélices, siendo la tercera la encargada de la unión al DNA y las primeras 2, aunque menos importantes para la interacción con el DNA, son importantes para interactuar con otras proteínas, incluyendo a la maquinaria basal de transcripción. Las proteínas con HD se agrupan en múltiples subfamilias dependiendo de criterios como la secuencia primaria del homeodominio, las secuencias que lo flanquean y la organización en clusters genómicos. Una subfamilia es la de proteínas con homeodominios TALE (TALE; Three Aminoacid Loop Extension), cuyos genes codifican para un homeodominio atípico que tienen una extensión de 3 aminoácidos extra entre las hélices 1 y 2, esta inserción parece tener importancia en la función de unión a DNA pero puede tener un papel importante en las interacciones proteína-proteína, especificando las interacciones con determinados factores de transcripción (Wotton, et. al., 1999, 1999b, 2001; Yang, et. al., 2000). Los miembros de esta familia son altamente divergentes a nivel de su secuencia primaria pues sólo cuentan con homología en la región que comprende al HD; se ha demostrado que pueden tanto activar como reprimir la transcripción y, además juegan papeles muy importantes en procesos biológicos muy diversos (Wotton, et. al., 2001).

TGIF fue identificado inicialmente como una proteína nuclear que se une al elemento de respuesta del receptor del ácido retinoico (RXR) en el promotor de la proteína de unión al retinol. Aunque el papel fisiológico que TGIF juega en la transcripción responsiva al ácido retinoico no es preciso ni

claro, se ha sugerido que reprime la transcripción al competir con los receptores retinoicos por la unión a DNA (Hamid, et. al., 2008; Wotton, et. al., 2001).

El gen que codifica a TGIF tiene 4 exones, siendo los 3 últimos los que contienen la información codificante, en estudios donde se hizo el knockdown de este gen, se observó que los ratones que carecen de *Tgif* resultaron viables y fértiles, pero, algunos mostraron defectos en la secuencia de lateralidad, posicionamiento incorrecto del corazón, defectos en los lóbulos pulmonares, sin embargo la penetrancia de cada defecto fue muy baja (Mar y Hoodless, 2006).

El gen *Tgif* humano se localiza en el cromosoma 18p11.2, en una región que contiene un locus HPE4 asociado con la holoprocencia (HPE; Holoprocencephaly), un desorden genético que afecta al cerebro y al desarrollo craneofacial, y que tiene una penetrancia y fenotipos que van desde defectos muy severos hasta individuos prácticamente normales, en 1999, Nanni y cols. reportaron que sólo el 10% de los pacientes que tienen una deleción en el brazo corto del cromosoma 18 (18p) que incluye la región donde se encuentra *Tgif* padecen de HPE, datos que sugieren que alteraciones en este gen no son totalmente responsables de causar esta enfermedad, sin embargo, una serie de mutaciones han sido encontradas en el gen las cuales han sido directamente vinculadas con la holoprocencia, TGIF tiene entonces un papel en el desarrollo temprano del cerebro (Nanni, et. al., 2000; Wotton, et. al., 1999b; Chen, et. al., 2003). Las mutaciones encontradas hasta el momento corresponden a sustituciones de aminoácidos S28C, P63R, R90C, T151A, S162F, Q107L las cuales, como se verá más adelante afectan la actividad transcripcional de TGIF, su capacidad de unirse al DNA, su dominio de interacción con Smad y su dominio de interacción con las proteínas HDACs. Se identificó además una mutación localizada en el homeodominio, Y59X causada por una transición 488C→G, que causa un truncamiento de la proteína (Gripp et al. 2000; Chen et al. 2002).

El RNA mensajero de TGIF está presente en una gran variedad de tejidos humanos adultos y sus niveles de expresión son muy variados. La expresión de TGIF parece estar regulada de manera más estricta en el cerebro donde se ha estudiado más a fondo. Además, TGIF ha sido implicado en procesos como la vascularización, el desarrollo de la placenta y enfermedades como la leucemia mieloide aguda, donde se ha visto que los pacientes con una expresión baja de esta proteína tienen una peor prognosis que los pacientes con niveles altos de TGIF. Participa también en otros tipos de cáncer humano, como por ejemplo en el carcinoma de esófago y en el cáncer gástrico

donde se ha demostrado que está sobreexpresado, en el carcinoma de transición celular de la vejiga donde se ha notado su amplificación, y se cree además que puede tener un papel en la hematopoyesis (Bartholin L., et. al., 2008; Hamid, et. al., 2008). Además, se le ha atribuido a TGIF una función en el proceso de proliferación de las células de mamíferos, experimentalmente se mostró que las células que carecen del gen *Tgif* proliferan más despacio que las células normales al no ser capaces de completar la fase G1 rápidamente como las células control. Se sabe además que para su función proliferativa TGIF requiere de su homeodominio, entonces, TGIF regula a los genes del ciclo celular a través de su unión al DNA o de interacciones proteína-proteína mediante su homeodominio y, considerando que sólo se ha demostrado actividad transcripcional represora para esta proteína, es posible que los genes blanco de TGIF sean inhibidores de la progresión de la fase G1 del ciclo celular (Mar y Hoodless, 2006).

TGIF se ha encontrado sobreexpresado en las células tumorales de hígado en estudios de comparación entre los perfiles de expresión génica de células normales y células tumorales y se cree que de alguna manera puede participar en la predisposición de estas células a la transformación maligna, en la literatura se ha manejado que TGIF puede formar parte de un perfil de malignidad tumoral ya que no se ha encontrado expresado en tumores considerados como benignos. En general, los niveles de TGIF están alterados en el cáncer, y los diferentes estudios indican que cualquier cambio aunque sea pequeño en la cantidad de TGIF puede tener un efecto dramático en el programa de desarrollo del cuerpo (Chen, et. al., 2003).

1.7.1. Estructura y función de TGIF

TGIF es una proteína de localización nuclear que tiene 272 aminoácidos. Experimentos de deleciones indican que TGIF contiene al menos dos dominios separados de represión transcripcional, RDs (RD; Repression Domain), uno de estos dominios denominado RD-1 se localiza en el extremo amino terminal y otro, el RD-2 en el extremo carboxilo terminal, el cual a su vez se subdivide en dos fragmentos llamados RD-2a y RD-2b que también son capaces de reprimir la transcripción (Figura 7).

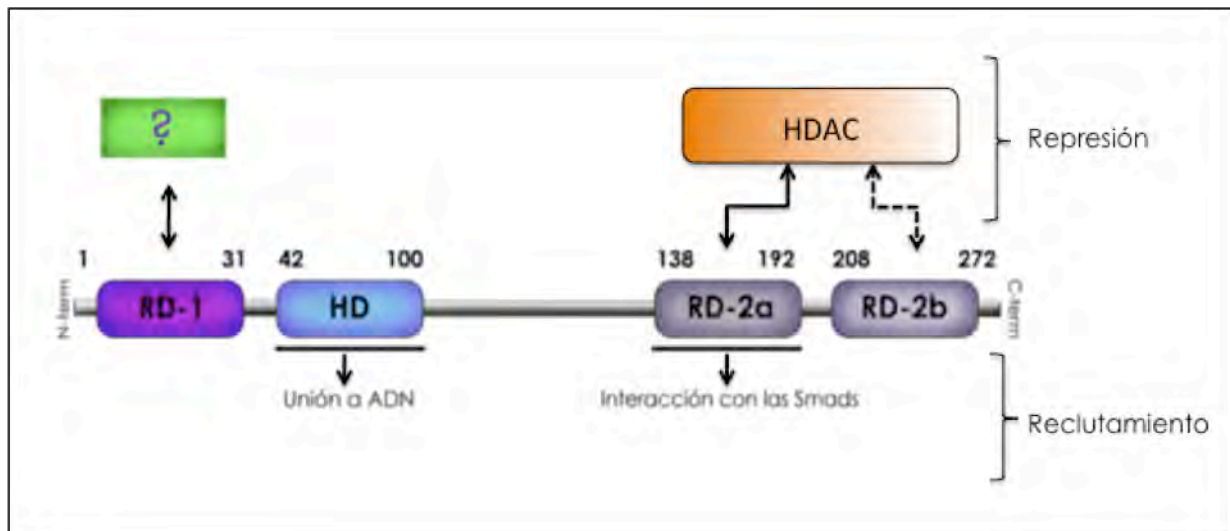
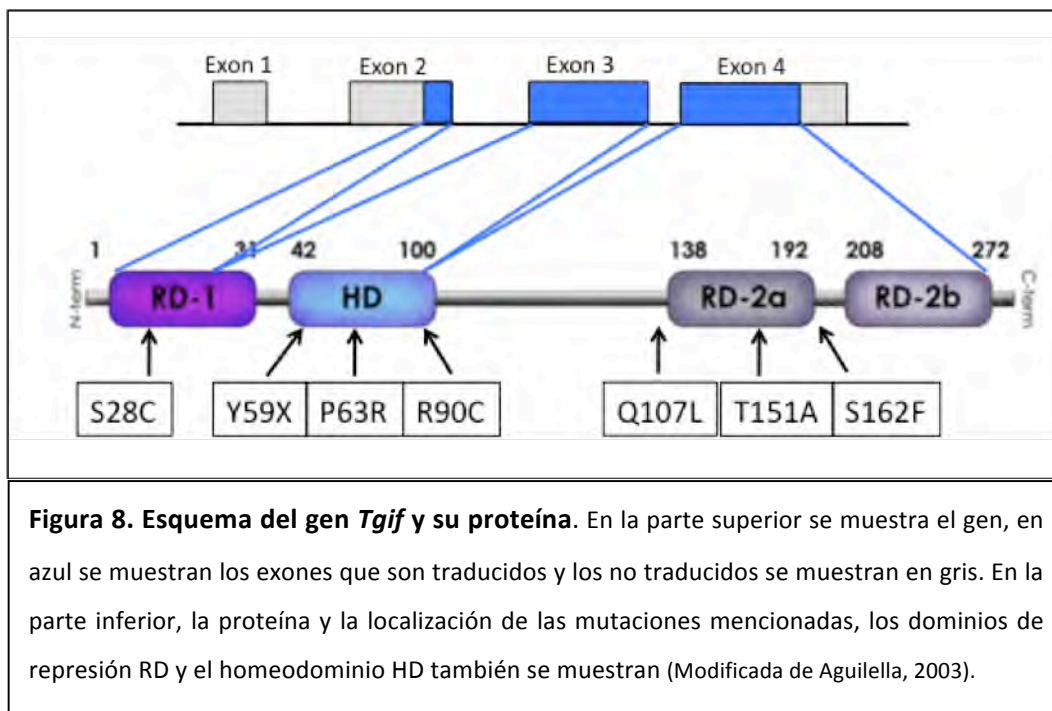


Figura 7. Análisis de la estructura y función de TGIF. TGIF contiene múltiples dominios de represión que participan en la unión al DNA y en la represión transcripcional. TGIF interacciona con el DNA y con las Smads activadas por TGF- β y es capaz de reprimir la transcripción de forma dependiente e independiente de su unión a las HDACs (Modificada de Wotton, 1999b).

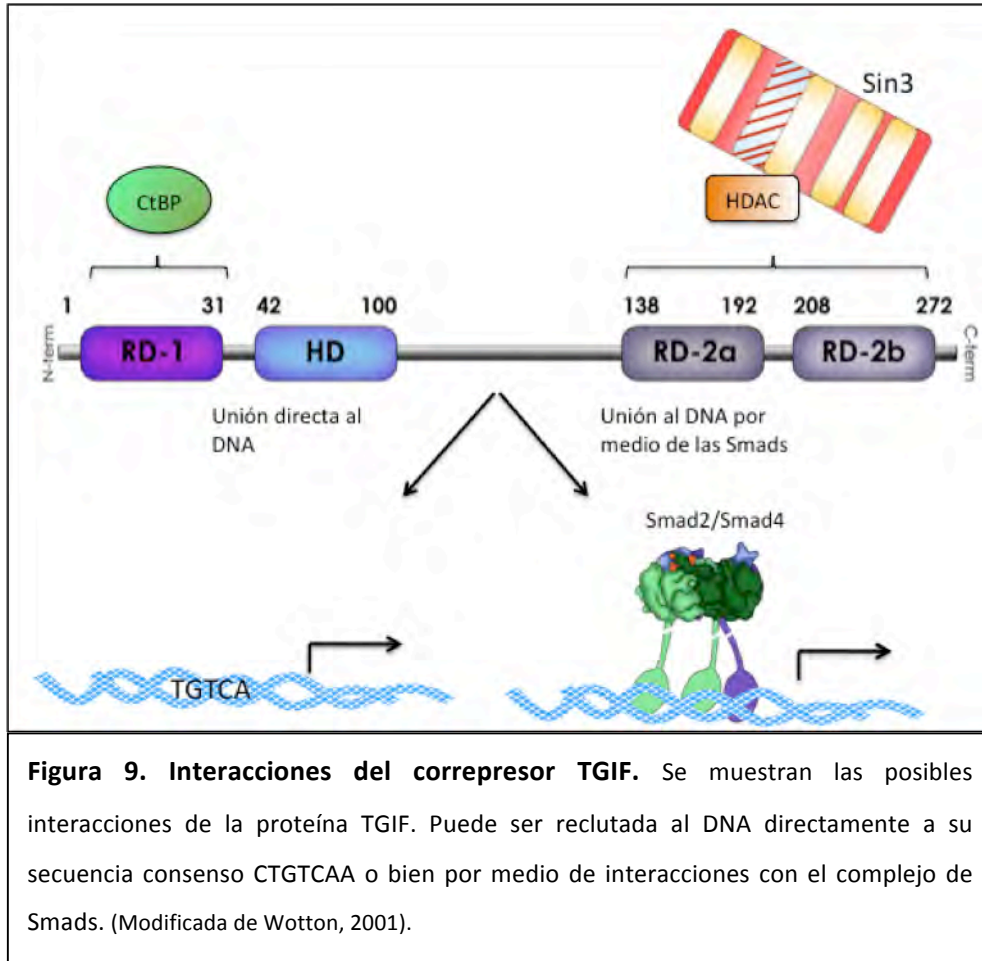
El dominio RD-1 en el amino terminal reprime la transcripción de manera independiente de las HDACs, la represión que lleva a cabo puede darse por medio de una interacción con factores de transcripción generales, o bien, puede reclutar a alguna otra proteína que actúe como segunda represora, lo cual le confiere a este dominio su habilidad represora. En la región del carboxilo terminal hay dos regiones que parecen contribuir a la represión transcripcional, la región RD-2a que interactúa directamente con las HDACs y cuya capacidad represora es dependiente de esta interacción, y la RD-2b representa un dominio aparte de represión por sí mismo mediante algún mecanismo que aún no se ha dilucidado o bien puede contribuir a la formación del complejo TGIF-HDACs. TGIF puede también reprimir por su unión directa al DNA vía su homeodominio pero ha sido probado experimentalmente que se requiere además la presencia del dominio de interacción con HDACs. En el DNA hay múltiples sitios de unión a TGIF con secuencia CTGTCAA, siendo los 5 nucleótidos de en medio los más importantes para la unión, donde se puede llevar a cabo esta represión, este proceso posiblemente requiera además otros factores. Por lo tanto, TGIF es una proteína que tiene capacidad de reprimir la transcripción de manera activa, sin embargo no se sabe

si tiene una capacidad intrínseca de represión o bien es un represor dependiente del contexto celular. Como ya se describió, se han identificado mutaciones relacionadas con la holoprocencia que afectan estos dominios descritos. De manera específica, la mutación S28C se encuentra en el RD-1 y por tanto afecta la represión transcripcional de esta proteína. Las mutaciones P63R y R90C se encuentran en el homeodominio, la primera, en la unión de las hélices 1 y 2 y la segunda dentro del homeodominio y afectan por tanto la capacidad de esta proteína de unirse al DNA, dentro del homeodominio se encuentra también la mutación X59Y que es la única mutación descrita hasta el momento que causa el truncamiento de la proteína. Las mutaciones Q107L, T151A y S162F se encuentran en la región de interacción con Smad2 y las HDACs. Es importante mencionar además que estas mutaciones se localizan en aminoácidos conservados también en la proteína TGIF de ratón y tienen relevancia en el correcto funcionamiento de esta proteína (Figura 8) (Aguilella et. al., 2000; Gripp et al. 2000; Chen et al. 2002; Nanni, et. al., 2000).



TGIF tiene además 2 dominios de reclutamiento, uno de unión al DNA y otro de unión a las proteínas Smad activadas por TGF- β . Hasta el momento sólo se ha demostrado la capacidad de reprimir, sin embargo, aunque no se ha podido demostrar que TGIF funcione como activador transcripcional, ya sea al unirse al DNA o al ser reclutado por algún complejo de Smads activado, no

se puede descartar la posibilidad de que bajo condiciones específicas ocurra una interacción con alguna proteína y se pueda activar la transcripción, o pueda participar al estabilizar la unión de alguna proteína con el DNA (Figura 9) (Wotton, et. al., 1999, 1999b, 2001; Melhuish, et. al., 2001; Chen, et. al., 2003).

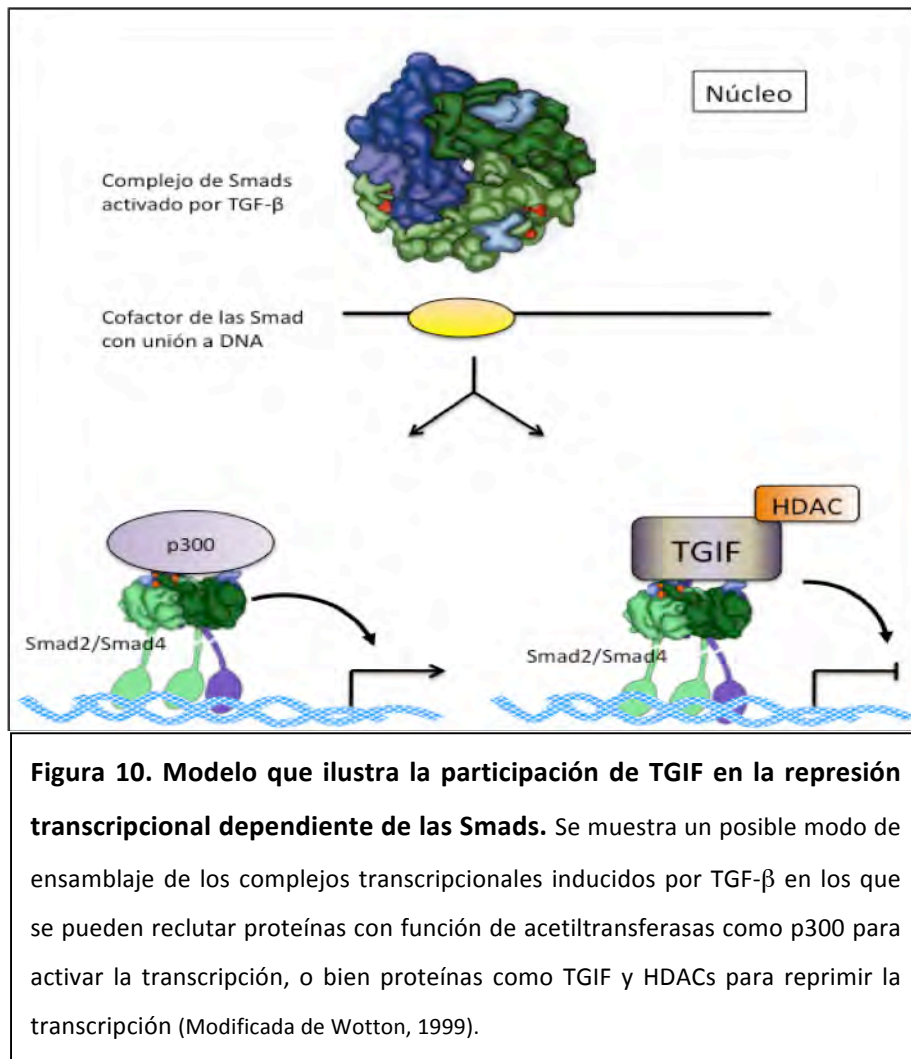


1.7.2. TGIF como correpresor de la Vía del TGF-β

Análisis de la actividad transcripcional de TGIF muestra que es una proteína que contiene dominios de represión que regulan la transcripción tanto a nivel basal como activo. Se ha demostrado que al asociarse con las Smads activadas por TGF-β, TGIF genera un complejo represor de la transcripción dependiente de las Smads (Wotton, et. al. 1999).

TGIF tiene la capacidad de reprimir la transcripción dependiente de Smad2/Smad3 al estar constitutivamente en el núcleo y así asociarse directamente con estas proteínas lo que lleva a un reclutamiento de TGIF a los elementos responsivos a Smads reprimiendo a los genes activados por

TGF- β . La actividad represiva del complejo TGIF-Smad depende en parte de la actividad de las desacetilasas de histonas reclutadas por TGIF y de la competencia con coactivadores transcripcionales como p300, para poder lograrlo, TGIF requiere tanto de su dominio de represión ubicado en el carboxilo terminal como del que está en el extremo amino (Wotton, et. al., 1999b; Chen, et. al., 2003) (Figura 10).



Por otro lado se sabe que el mensajero de TGIF aumenta tras el estímulo con TGF- β , lo que estaría sugiriendo que TGIF es un blanco del TGF- β y además, que es probable que participe en la represión de esta vía por medio de un asa de retroalimentación negativa es decir, estaría desensibilizando la acción del TGF- β y de las activinas. Por eso se cree que Smad7, SnoN y TGIF estarían participando en la regulación de la señal del TGF- β y de las activinas a diferentes niveles (Chen, et. al., 2003).

1.7.3 TGIF y otras vías de señalización

Además de activar a la proteínas Smad, se sabe que el TGF- β es capaz de activar otras vías de señalización como es el caso de la vía de las cinasas JNK, estas cinasas citoplásmicas que fosforilan residuos de serinas y treoninas se activan por TGF- β a través de las MAPKs. Esto es relevante pues se ha visto que la activación de la cascada JNK bloquea la habilidad de Smad2 para activar a las proteínas FAST en respuesta a TGF- β . La proteína TGIF es importante en este contexto ya que c-Jun es capaz de mediar su asociación con Smad2. TGIF desempeña entonces su papel de correpressor a nivel transcripcional pues interfiere con la unión de Smad2 con el coactivador p300. Esta comunicación cruzada entre dos vías de señalización activadas por TGF- β es importante ya que le permite a la célula tener distintos patrones de respuesta a una citocina, dependiendo de la activación relativa de las Smads en competencia con la vía de señalización de las cinasas JNK (Pessah, et. al., 2001).

En otra vía de señalización, la del ácido retinoico, se ha encontrado también la participación de TGIF. El RA (Retinoic Acid; Ácido Retinoico) es conocido por tener un papel importante en el desarrollo embrionario. Ha sido descrita la capacidad de TGIF de interactuar de manera específica con el receptor RXR α de esta vía, reclutar al correpressor CtBP e inhibir de esta manera la transcripción activada por el RA. Se ha demostrado que TGIF es reclutado al promotor de los genes blanco del ácido retinoico reprimiéndolos, es posible entonces que la pérdida de TGIF imite un aumento en la señal del ácido retinoico contribuyendo a fenotipos como el de la HPE, por lo tanto podría ser que las mutaciones de TGIF que causan HPE se deban a perturbaciones en esta vía. Debido al papel que TGIF tiene en la vía del TGF- β es posible que de alguna manera regule una comunicación cruzada entre estas dos vías aunque también es posible que sus papeles en ambas vías sean independientes el uno del otro (Bartholin, et. al., 2006).

En la vía del HGF (Hepatocyte Growth Factor; Factor de crecimiento de los hepatocitos) el TGIF es regulado positivamente y bloquea así la transcripción de los genes mediada por las Smads e inducida por TGF- β . Este aumento de la proteína TGIF por HGF es mediado en gran parte por su capacidad de estabilizarlo y no tanto porque se induzca la expresión de su gen. El HGF reestablece la expresión de TGIF en distintos contextos *in vivo* como se ha visto en estudios con glomérulos

ratones con diabetes. Este es un ejemplo de la interacción que puede existir entre el TGF- β (un profibrótico) y el HGF (un antifibrótico), aunque hace falta determinar los contextos celulares en los que se lleva a cabo la interacción de estas vías y las bases moleculares de la acción de estas citocinas (Dai y Liu, 2004).

El EGF (Epidermal Growth Factor; Factor de Crecimiento Epidérmico) puede también inhibir la vía del TGF- β , y no lo hace bloqueando la acumulación de Smad2/3 en el núcleo sino que logra estabilizar a TGIF mediante una fosforilación mediada por la vía EGFR/Mek/Erk lo que favorece la formación de complejos Smad2/TGIF en respuesta al TGF- β . De esta manera la elevación de los niveles de TGIF ya sea por su sobreexpresión o por la inhibición de su degradación son suficientes para inhibir la expresión inducida por TGF- β . Esta interacción entre vías es dependiente del contexto celular y se ha probado experimentalmente para la tropoelastina, un blanco del TGF- β , este mecanismo es además independiente de otros mecanismos por los cuales TGIF puede inhibir a la vía del TGF- β como es el de la vía de las JNKs (Yang, et. al., 2008; Lo, et. al., 2001).

El papel de estas vías de señalización es muy importante pues sus señales están implicadas en el control de la participación de TGIF y en la estabilidad de esta proteína, sus funciones específicas en la homeostasis de los organismos aún no está dilucidada pero pudiera ser que de alguna manera la expresión de genes blanco del TGF- β como *sno* y *smad7* estuviera siendo regulada indirectamente. Es posible, por lo tanto, que exista una comunicación cruzada entre las vías de señalización mencionadas anteriormente y la vía del TGF- β para regular específicamente la expresión de *sno* y *smad7*. Por lo tanto cualquier control, ya reprimiendo o activando estas vías puede tener un rol crítico en el resultado final del estímulo con TGF- β y por lo tanto, puede alterar dramáticamente el programa de desarrollo especificado por estos factores (Lo, et. al. 2001).

1.8. Genes blanco del TGF- β

La amplia gama de funciones que tiene el TGF- β está directamente asociada a la activación o inhibición de genes blanco precisos, esto a su vez depende del contexto celular, es decir, de las proteínas y factores que se encuentran disponibles en determinado momento y tipo celular y que son capaces de unirse a los promotores de los genes blanco de esta citocina. Mediante estudios con microarreglos se ha logrado la identificación de diversos genes regulados por el TGF- β , los cuales

codifican para proteínas con gran diversidad en su función, por ejemplo, receptores membranales, proteínas cromosomales, transportadores, factores de transcripción, componentes de matriz extracelular, reguladores del ciclo celular, etc. (Akiyoshi, et. al., 2001).

*1.8.1. Los genes *sno* y *smad7* son genes blanco del TGF- β .*

Se ha encontrado que *SnoN* y *Smad7*, represores de la vía del TGF- β , son activados transcripcionalmente por la misma citocina, siendo su regulación transcripcional parte de una asa de retroalimentación negativa.

Para el caso de *sno*, se ha reportado que a las dos horas después del estímulo, el TGF- β induce un aumento en los niveles de su mRNA con el fin de reestablecer los niveles basales del correpresor que a su vez va a regular la señal del TGF- β (Stroschein, et. al. 1999). Se sabe además que la expresión es inducida por medio de la unión del complejo Smad2/Smad4 al elemento de respuesta al TGF- β (TRE) en el promotor *sno* murino, y que el complejo Smad3/Smad4 inhibe la transcripción si se une al sitio de inhibición de las Smad (SIE) en este mismo promotor, el cual fue caracterizado en 2005 por Luo y colaboradores, en un estudio donde se señala que la zona de respuesta a TGF- β es de aproximadamente 400 pb, y dentro de ella existen 4 SBEs, cada uno de los cuales tiene el mismo efecto relativo sobre la regulación transcripcional, ya que sólo se abate la activación de la transcripción de *sno* si se inhabilitan los 4 SBEs de manera simultánea (Zhu, et. al., 2005) (Tabla 1).

En el promotor de *sno* se encuentra también un elemento de respuesta a HGF, lo que explicaría en parte el papel antagónico del HGF con respecto al TGF- β pues HGF induce la expresión del correpresor de los efectores de la vía del TGF- β , cabe señalar que esta inducción se lleva a cabo a través de la ruta de las MAPK (Ruoyun, et. al. 2007).

Especie		Secuencia 5'-3'	No. de bases	% de similitud
SBE 1	Humano	atcctgtctg g ccggg g g g caccgcagacag g ccg	36	92
	Ratón	atcctGTCTgagccggg g caccgcAGACagc g ccg	34	
SBE 2	Humano	Ccagcttcccagacggcg g cg g ggg	25	88
	Ratón	ccagccgcccAGACggcg g CC g ggg	25	
SBE 3	Humano	Ccacaataggccagacggcg g cg g cg	26	96
	Ratón	ccacaatagggCAGAcggcg g cg g cg	26	
SBE 4	Humano	cggccggagacggcg g cg g ctctgcggga	30	100
	Ratón	cggccggAGAcggcg g cg g cGTCTgcggga	30	

Tabla 1. SBEs detectados en la zona de respuesta al TGF- β del promotor de *sno* en ratón y humano. Estas regiones fueron definidas como SBE 1, 2, 3, y 4 aunque cada una de estas secuencias presenta 2 sitios consenso SBE, excepto la región 3 que presenta solamente uno. En verde se resaltan las diferencias entre ambas especies. En mayúsculas las bases que al ser mutadas afectan la unión de las Smads (Zhu, et. al., 2005).

Por otro lado, la caracterización del promotor del gen ***smad7*** permitió encontrar una región mínima entre el nucleótido -408 y el +112, un fragmento de 520 pb adyacente a la secuencia del cDNA de Smad7 que contiene un SBE y que es capaz de inducir la transcripción en células estimuladas con TGF- β . El SBE de este promotor es una secuencia palindrómica GTCTAGAC ubicada entre los nucleótidos -285 y -278 en donde se unen las Smads 3 y 4 de manera específica y sin necesidad de otros factores, sin embargo, en algunos reportes se ha mencionado que sí se necesita de otros factores para la transcripción eficiente del gen *smad7*. Como ya se mencionó la transcripción de este gen crea una asa de retroalimentación negativa para la vía del TGF- β , pero, además, se han encontrado en el promotor de *smad7* sitios de unión a otros factores, lo que nos indica que este

gen pudiera ser regulado por otros estímulos además del TGF- β , como lo es el del EGF o el IFN- γ , entre otros (Nagarajan, et. al., 1999; Hua, et. al., 2000; Nakao, et. al. 1997; Afrakhte, et. al. 1998; Denissova, et. al., 2000; Denissova, et. al. 2004) (Tabla 2).

Especie	Secuencia 5'-3'	pb
Humano	TAGAAACCCGATCTGTTGTTTGCGAAACACAATCGCTTTTTTTTTTTTTAAAGCGACA	1-60
Ratón	TAGAAACCCGATCTGTTGTTTGCGAAACACAATCGCTTTTTTTTTTTT-AAAGCGACA	1-58
Humano	GGG GTCTAGAC GGCCACGTGACGAGCCGGAGCCGGCGGCCACTGCGCAGTGAACC	61-120
Ratón	GGG GTCTAGAC GGCCACGTGACGAGCCGGAGCCGGCGCGC-ACTGCGCAGTGAACC	59-117
Humano	AGCCGAGCAGAGG	121-133
Ratón	AGCCGAGCAGAGG	118-130

Tabla 2. Región promotora del gen *smad7*. Se muestra un alineamiento de 132 pb del promotor de *smad7* de humano y ratón en el que se observa su similitud y la conservación del SBE. que se muestra en color rosa.

2. Antecedentes

El efecto del TGF- β sobre la expresión de los genes *sno* y *smad7* hace que sea posible una regulación negativa de la vía, por eso ha sido importante conocer la regulación de estos genes a nivel transcripcional. En primera instancia, ha sido reportado que los niveles de RNAm de *sno* y *smad7* aumentan después del estímulo con TGF- β , estos genes son regulados directamente por las Smads y no requieren de la síntesis de otras proteínas o la activación de otras vías para su inducción (Vázquez-Macías, et. al., 2005; Briones-Orta, et. al, 2006; Denissova, et. al. 2004).

Además, en trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio se identificó la secuencia que corresponde a la región promotora del gen *sno* de ratón y de humano que responde al TGF- β , esta secuencia fue clonada a la par con la porción de la región promotora de *smad7* que contiene al SBE en el vector pGL3-Basic (Promega) el cual es un vector que fue diseñado para el análisis cuantitativo de factores de regulación génica en los mamíferos como son, por ejemplo, los promotores. Mediante ensayos con genes reporteros de luciferasa se demostró la regulación positiva de estos promotores por TGF- β , confirmando lo ya reportado (Tecalco-Cruz, 2008; Domínguez-Hüttinger, 2008). Para el caso del gen *sno* se encontró que TGF- β provoca una inducción de 2-2.5 veces con respecto a su control, y para el promotor de *smad7* se obtuvo una inducción de aproximadamente 4 veces. Se sabe también que el promotor del gen *smad7* se encuentra reprimido en su estado basal por los correpresores Ski y SnoN. El correpresor SnoN puede además unirse al promotor del gen *sno* regulando por un asa de retroalimentación la expresión de su propio gen. Todos estos datos nos indican que ambos genes necesitan ser regulados de una manera muy específica debido a su capacidad de modular la señal del TGF- β , y como se ha mencionado, una regulación deficiente puede llevar a diferentes patologías, esto entonces sugiere un mecanismo complejo en la regulación transcripcional de estos dos genes. El correpresor TGIF, que es en sí mismo un gen blanco del TGF- β y se ha demostrado que es una proteína reguladora de la expresión de los genes blanco de las Smads, al igual que SnoN y Smad7, sin embargo, no se cuenta con evidencia experimental de los genes que pudiera estar regulando, por lo que se puede suponer que puede ser uno de los

factores que participan en la regulación transcripcional de los genes *sno* y *smad7* (Tecalco-Cruz, 2008; Briones-Orta, 2006; Chen, et. al. 2003).

3. Planteamiento del problema

El mantenimiento de los niveles de SnoN y Smad7 es primordial en la homeostasis celular, y la regulación de su expresión parece ser algo característico en distintos eventos fisiológicos y puede encontrarse alterada en distintas patologías que presentan una sobreexpresión o una disminución de sus niveles. Si bien, hasta ahora se ha demostrado que ambos genes son blancos del TGF- β , aún no se conoce bien la regulación de su expresión a nivel basal ni el cómo y en qué momento se modula su expresión luego del estímulo del TGF- β , pero es posible que la participación de algunos correpresores como SnoN, Ski y TGIF, y de ciertos factores de transcripción regulados incluso por otras vías pudiera ser trascendental para el control de la expresión de *smad7* y *sno*. Los escenarios que consideramos importantes para explorar la expresión de estos genes son aquellos que involucran procesos de proliferación y diferenciación celular. En este proyecto en particular se pretende caracterizar si el correpresor TGIF tiene efecto sobre la expresión de *sno* y *smad7* y determinar el papel que esta regulación pueda tener en procesos de proliferación celular, como podrían ser, por ejemplo, la carcinogénesis o la regeneración tisular.

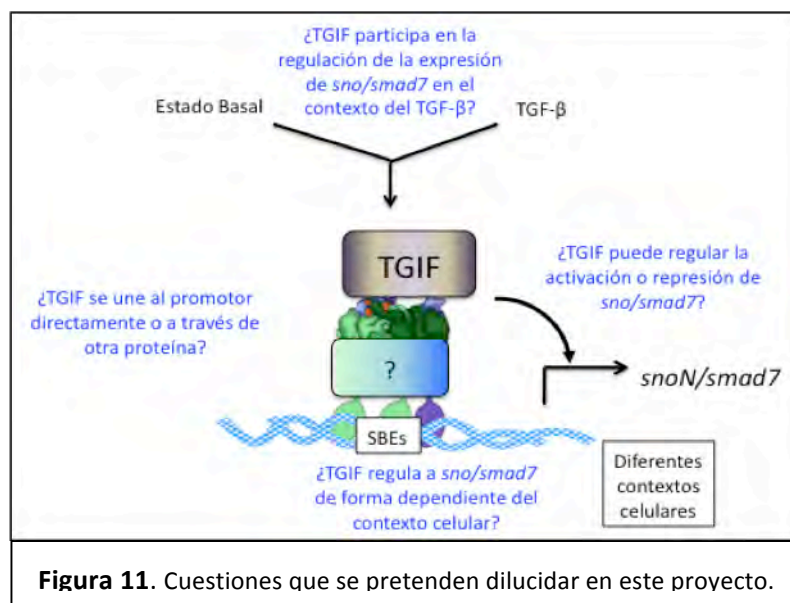


Figura 11. Cuestiones que se pretenden dilucidar en este proyecto.

4. Hipótesis

El correpresor TGIF ejerce una regulación transcripcional negativa de los genes *sno* y *smad7* tanto en condiciones basales como en el contexto de las señales del TGF- β .

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar si TGIF tiene un efecto en la regulación transcripcional de los genes *sno* y *smad7* y determinar este efecto tanto en condiciones basales como en el contexto de las señales del TGF- β .

5.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto de TGIF sobre la región de los promotores de los genes *sno* y *smad7* que responde al TGF- β mediante ensayos con genes reporteros.
- Determinar el efecto de TGIF sobre los niveles de RNAm de *sno* y *smad7* a nivel de RNA mensajero.
- Determinar si existe unión de la proteína TGIF a los promotores de los genes *sno* y *smad7* a nivel basal y, con el estímulo del TGF- β .
- Establecer un posible mecanismo mediante el cual TGIF esté regulando la expresión de los genes *sno* y *smad7*.

6. Materiales y Métodos

6.1 Bioinformática

En trabajos realizados previamente en el laboratorio se identificó y localizó el gen *sno* en el genoma de ratón, rata y humano. Para el caso del ratón y humano se encontró en el cromosoma 3 y sus secuencias correspondientes son la AC117590 y la AC073288/NT_005212 mientras que para la rata se usó la secuencia NW_047625 ubicada en el cromosoma 2. Para el gen *smad7* se obtuvieron las secuencias del promotor directamente del GeneBank; AF254791, AF167314, AF156727 para ratón, rata y humano respectivamente. Se identificó además la región responsiva a TGF- β que fue clonada para análisis posteriores (Tecalco-Cruz, 2008; Domínguez-Hüttinger, 2008). El análisis por bioinformática de este proyecto consistió en el uso de estas secuencias previamente identificadas para realizar un análisis de los posibles factores transcripcionales que se unen al promotor de los genes *sno* y *smad7* usando el programa Match – 1.0 Public (Matrix Search for Transcription Factor Binding Sites), un programa diseñado para la búsqueda de sitios potenciales de unión para factores de transcripción en secuencias específicas de nucleótidos, este análisis se realizó con el objetivo particular de ver si la proteína de interés TGIF cuenta con sitios de unión en los promotores de estos genes.

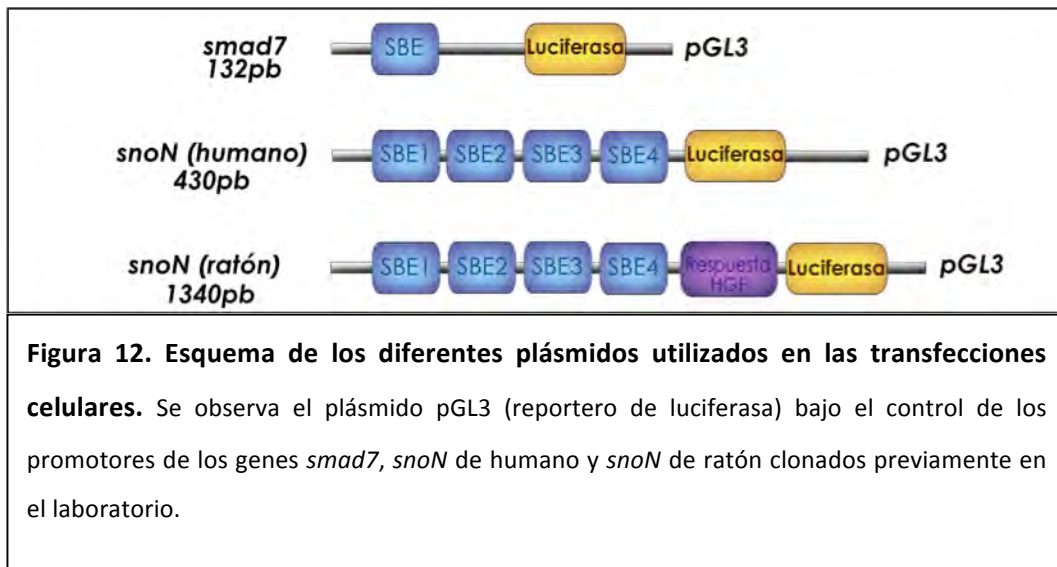
6.2. Cultivos celulares

En este proyecto se emplearon tres líneas celulares: AD293 (células de riñón embrionario humano transformadas por adenovirus), HepG2 (células de hepatoma humano) y C9 (hepatocitos de rata). Todas las células se mantuvieron en medio DMEM (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Multicell, Winset), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina. Todos los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera con un aporte constante de CO₂ al 5%.

6.3. Transfecciones celulares

Las células AD293, HepG2 y C9 se cultivaron en placas con 12 pozos. Cuando se obtuvo una confluencia del 75% en un medio con 10% de suero fetal bovino las células se

transfectaron transitoriamente con 1 μg /pozo de los plásmidos correspondientes mediante el método de fosfato de calcio. Los plásmidos transfectados incluyen a los genes reporteros de la luciferasa, uno bajo el control de la región del promotor del gen *smad7* que contiene al SBE de 132 pb, otro con una región del promotor del gen *sno* humano de 430 pb que contiene 4 SBEs y otro con una región del promotor del gen *sno* de ratón que incluye además de los 4 SBEs a la región responsiva a HGF, todos estos plásmidos fueron clonados previamente en el laboratorio (Tecalco-Cruz, 2008) (Figura 12).



En algunos casos se cotransfectaron diferentes construcciones de TGIF (proporcionadas por el Dr. Jeff Wrana del Mount Sinai Hospital en Toronto, Canadá) las cuales fueron creadas por PCR o usando enzimas de restricción internas a la secuencia de TGIF y clonadas en un vector de expresión pCMV5 modificado que contiene dos copias del epítipo HA o una copia del epítipo Flag (Figura 13), esto se hizo con el objetivo de ver el efecto que tiene TGIF o las mutantes de TGIF (Figura 14) sobre los genes *smad7* y *sno*. Para estos ensayos, las células se transfectaron además con los plásmidos que contienen al gen de la β -galactosidasa bajo el promotor CMV (pCMV- β gal) que sirvió para normalizar la actividad de la luciferasa. Al día siguiente de la transfección, las células se incubaron dos horas en un medio de ayuno con 0.2% de suero fetal bovino con el objetivo de evitar que se enmascare el efecto del TGF- β por los factores de crecimiento del suero. Dichas células

recibieron entonces un estímulo de TGF- β a una concentración final de 100pM (0.1 nM) por pozo y se incubaron así toda la noche para permitir la expresión por TGF- β de los diferentes genes blanco.

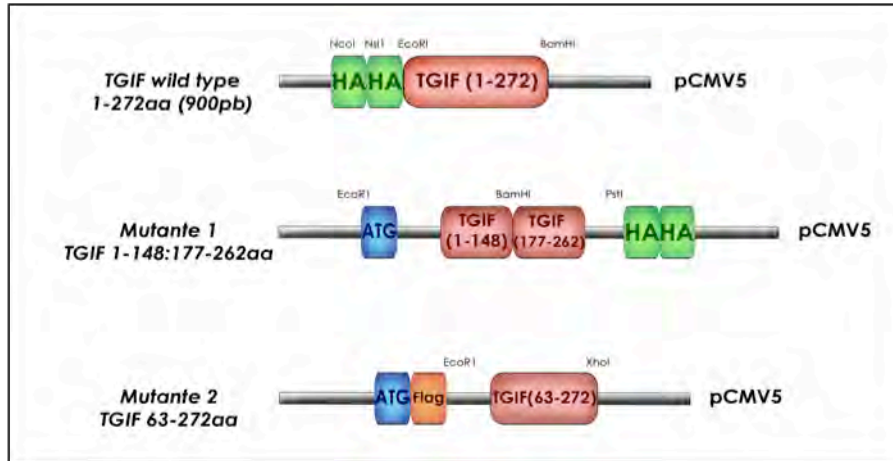


Figura 13. Esquema de las diferentes construcciones de TGIF utilizadas en las transfecciones celulares. Estas construcciones fueron generadas por PCR o utilizando enzimas de restricción internas, fueron posteriormente clonadas en el vector de expresión pCMV5 modificado que contiene una copia del epítipo Flag o bien, dos copias del epítipo HA. Estas construcciones fueron proporcionadas por Jeff Wrana.

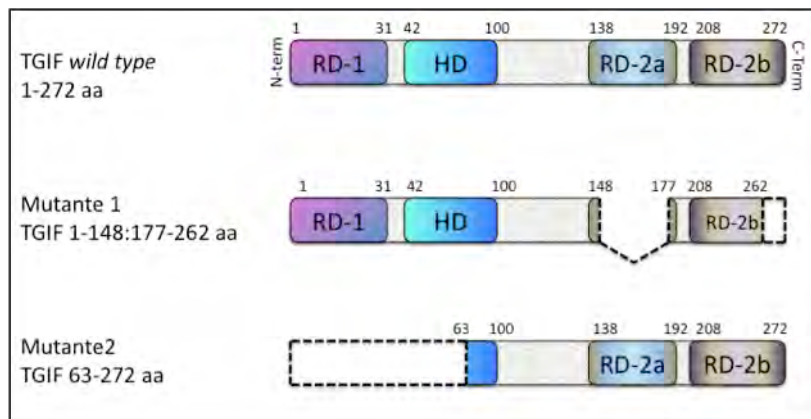


Figura 14. Esquema de las diferentes mutantes de TGIF. En el esquema se muestra la estructura de los diferentes productos génicos expresados en las células trasfectadas. Nótese que la Mutante 1 (1-148:177-262) pierde su dominio de interacción con las proteínas Smad y la Mutante 2 (63-272) pierde tanto uno de sus dominios de represión como su dominio de unión al DNA (Wotton, 1999b).

6.4. Reactivos y anticuerpos

En este proyecto fueron empleados los siguientes anticuerpos policlonales: anti-TGIF (H-172), anti-SnoN (H-317), anti-Ski (H-329), anti-Smad2/3 (N-19). También se usó como control el anticuerpo monoclonal anti- β -actina (C4) (F1907). Todos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano de Zymed. Y para la estimulación celular se utilizó TGF- β 1 de R&D Systems y de Preprotech.

6.5. Ensayo de luciferasa

El medio de las células tratadas fue removido un día después de haberlas estimulado, se hizo un lavado con 1 ml de PBS. Las células se resuspendieron en 50 μ l de un buffer de lisis especial para el ensayo de luciferasa (Reporter Lysis Buffer 5X, Promega). Las células fueron lisadas por 10 minutos en agitación a 4°C, con ayuda de un gendarme se pasaron a microtubos de 1.5 ml que se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante fue separado y sometido a la reacción de luciferasa, la cual fue iniciada al mezclar en un tubo nuevo 5 μ l del lisado con 25 μ l del reactivo de luciferasa (Luciferase Assay Reagent, Promega), las unidades lumínicas fueron determinadas usando un luminómetro. Para normalizar los valores obtenidos de luciferasa 10 μ l de cada muestra obtenida fueron sometidos al ensayo de β -galactosidasa, el cual consiste en agregarle a los 10 μ l de lisado 90 μ l de una mezcla de Buffer Fosfato de Potasio 50 mM (pH 6.6) que contiene Mn^{+2} 0.1 mM (cofactor) y ONPG como sustrato artificial como específica el proveedor, la reacción que produce ONP y D-galactosa se lleva a cabo a 37°C. La producción de ONP se determina colorimétricamente ya que absorbe luz a 415 nm en solución alcalina. Estos ensayos fueron realizados por triplicado para cada condición.

6.6. Extracción de proteínas totales

Las células se cultivaron en cajas de 100 mm de diámetro, cuando alcanzaron una confluencia del 75% fueron transfectadas transitoriamente usando lipofectamina (Invitrogen), usando 3 μ g por caja del DNA correspondiente a los diferentes plásmidos mencionados anteriormente. Las cajas de células en monocapa fueron colocadas sobre

una cama de hielo, el medio de cultivo fue removido y las células se lavaron dos veces con PBS frío. Para lisar a las células se les agregó 1 ml de Buffer TNTE 0.5% (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM EDTA, Tritón X-100 0.5%) frío con inhibidores de proteasas y fosfatasa (apéndice) en cada caja. Las células fueron raspadas con ayuda de un gendarme y se dejaron en agitación a 4°C por 15 min. Transcurrido ese tiempo, los lisados fueron transferidos a tubos para microcentrífuga estériles de 1.5 ml previamente enfriados y posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a tubos nuevos y se procedió a cuantificar la proteína obtenida por el método de Bradford para usarse después en el Western Blot.

6.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se elaboran geles de poliacrilamida al 12% para correr las muestras obtenidas puesto que TGIF tiene un peso de aproximadamente 32 kDa. A 80 µg de proteínas totales de cada experimento se les adicionó solución de Laemmli para electroforesis, se desnaturalizaron por 3 min a 100°C para luego ser separadas por electroforesis.

6.8. Western Blot

Después de separar las proteínas en el gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de PVDF (BIO-RAD) con un buffer de transferencia durante 1 hora a 100 V. Posteriormente se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en TBST al 0.1% (TBST 1X: 20 mM Tris pH 7.6, 0.1 M NaCl, 0.1% tween 20) en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente en una dilución 1:1000 en TBST 1X a 4°C toda la noche. Al día siguiente, la membrana fue lavada tres veces con TBST 1X por 5 min y luego incubada durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP; Horseradish Peroxidase) en una dilución 1:10,000 en TBST 1X. Por último, cada membrana fue lavada tres veces con TBST 1X por 10 min. Finalmente se realizó la detección de las proteínas empleando el kit de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific Pierce).

6.9. Extracción de RNA total

Las células se cultivaron en cajas de 10 cm, cuando alcanzaron una confluencia del 75% fueron transfectadas transitoriamente usando lipofectamina (Invitrogen), se usaron 3 μg por caja del DNA correspondiente a los diferentes plásmidos mencionados anteriormente, después de esto se retiró el medio de cultivo de cada caja de células y se le agregaron 5 ml de Trizol (Invitrogen). Se homogeneizó la mezcla pipeteando y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Las muestras se transfirieron entonces a tubos cónicos estériles de 15 ml adicionando 200 μl de cloroformo por cada ml de Trizol empleado, se mezcla vigorosamente por 15 seg y se incuba a temperatura ambiente por 3 min para luego centrifugar por 45 min a 4°C a 3500 rpm. Después de la centrifugación se obtuvieron 3 fases: una fase acuosa (superior) que contiene al RNA, una interfase que contiene DNA y proteínas. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo estéril y se precipitó el RNA agregando 0.5 ml de isopropanol frío por cada ml de Trizol empleado, se agitó vigorosamente y se centrifugó nuevamente a 4°C a 3500 rpm por 45 min. Se retiró el sobrenadante y se obtuvo una pastilla de RNA total, el cual se lavó con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua previamente tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC).

6.10. Ensayo de RT-PCR

Para los ensayos de transcripción reversa (RT) 4 μg de RNA total fueron tratados con DNAsa I (Invitrogen), se empleó 1 U de DNAsa por cada μg de RNA total, en un volumen final de 10 μl con buffer de reacción 1X. Las muestras se incubaron por 15 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, la DNAsa se inactivó al agregar 1 μl de EDTA 25 mM. Las muestras se calentaron a 65°C por 10 min. Una vez que el RNA quedó libre de DNA se procedió a realizar la transcripción reversa empleando la enzima SuperScript II RT, para llevar a cabo la síntesis de la primera cadena de cDNA se adicionaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml nuevo y estéril los siguientes componentes: 2 μg de RNA total tratado con DNAsa I, 1 μl de hexámeros al azar y 1 μl de dNTPs 10 mM, esta mezcla se incubó a 65°C por 5 min y se transfirió a hielo donde se agregaron los demás componentes: Buffer de Reacción 1X, DTT 0.1 M y 1 μl de la enzima

SuperScript II en un volumen final de 20 µl, los componentes fueron mezclados mediante pipeteo suave y se procedió con el siguiente programa de incubación: 10 min a 25°C, 50 min a 42°C, 15 min a 70°C y, finalmente las muestras se mantuvieron a 4°C. Una vez que se obtuvo el cDNA, éste fue empleado como templado para llevar a cabo las reacciones de PCR.

Se realizaron ensayos de PCR con los cDNAs obtenidos y con oligonucleótidos correspondientes a los genes *smad7*, *sno* y como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura

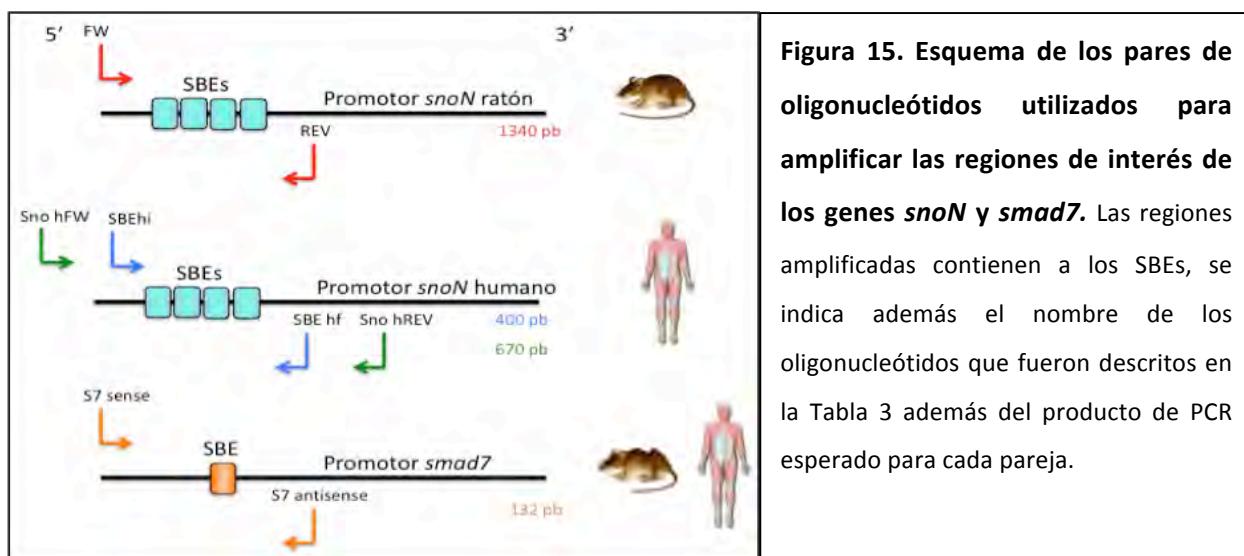


Figura 15. Esquema de los pares de oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones de interés de los genes *snoN* y *smad7*. Las regiones amplificadas contienen a los SBEs, se indica además el nombre de los oligonucleótidos que fueron descritos en la Tabla 3 además del producto de PCR esperado para cada pareja.

15.

La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

PCR ciclos	<i>β-actina</i>	<i>smad7</i>	<i>sno humano</i>	<i>sno ratón</i>
1	5 min - 95°C	5 min - 95°C	5 min - 95°C	5 min - 95°C
30	1 min - 95°C	1 min - 95°C	30 seg - 95°C	30 seg - 95°C
	1 min - 55°C	1 min - 65°C	30 seg - 63.5°C	30 seg - 65°C
	1 min - 75°C	1 min - 75°C	1 min - 75°C	1 min - 75°C
1	5 min - 75°C	5 min - 75°C	5 min - 75°C	5 min - 95°C
Fin de la reacción	4°C	4°C	4°C	4°C

Finalmente, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

6.11. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

6.11.1. Preparación de la cromatina

La inmunoprecipitación de cromatina se realizó con las células AD293 en cajas de 10 cm de diámetro a un 75% de confluencia y en ayuno desde una noche previa al experimento. Las células se trataron con formaldehído al 11% por 20 min a 37°C con el fin de entrecruzar a las proteínas con el DNA. La reacción se detuvo con la adición de glicina 0.2 M, las células se incubaron 5 min en hielo y después se lavaron con PBS frío. Las células fueron raspadas con un gendarme y recolectadas en tubos cónicos de 15 ml. Se centrifugaron a 2000 rpm y se procedió al aislamiento de núcleos que se efectuó al resuspender la pastilla celular en 5 ml de buffer de lisis (Buffer 1, apéndice) adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasas y se incubó por 10 min a 4°C en agitación, posteriormente los núcleos fueron recolectados por centrifugación a 2000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue aspirado y la pastilla con los núcleos se resuspendió en 4 ml de buffer 2 (Buffer 2, apéndice) adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasas para liberar a la cromatina, se dejó en agitación por 10 min a 4°C. Nuevamente se realizó una centrifugación a 2000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue retirado y la pastilla fue resuspendida en 3 ml de buffer de resuspensión (Buffer 3, apéndice) adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasas para ser sometido a sonicación. La sonicación de la cromatina se llevó a cabo con la muestra en hielo y aplicando 10 ciclos de 30 seg de sonicación con intervalos de 1 min con un sonicador Fisher Sonic Dismembrator 300, se obtuvieron fragmentos de DNA de aproximadamente 300-600 pb. Después se realizó un preaclaramiento de las muestras con el propósito de disminuir interacciones inespecíficas, para esto se adicionaron 30 µl de proteína G bloqueada previamente como se indica en el apéndice, y se dejó mezclándose toda la noche a 4°C. Al siguiente día las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 min a 4°C y el sobrenadante con la cromatina “limpia” fue transferido a un tubo nuevo y se guardó a -70°C o se prosiguió con el protocolo.

6.11.2. Inmunoprecipitación de la cromatina

Para la inmunoprecipitación de las proteínas de interés se hizo una mezcla utilizando 250 μ l de cromatina “limpia”, 250 μ l de buffer de precipitación (apéndice) y 5 μ l del anticuerpo correspondiente: anti-Smad2/Smad3, anti-TGIF, anti-SnoN, anti-Ski ó anti- β actina (control negativo). Esta mezcla se incubó toda la noche a 4°C en agitación, se reservaron 100 μ l de cromatina en un tubo adicional por cada condición experimental, para cuantificar la cantidad inicial de cromatina (Input). Al día siguiente se agregaron 20 μ l de proteína G-sefarosa a cada muestra para recolectar los complejos DNA-proteína-anticuerpo y se incubó a 4°C por 3 horas en agitación, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 30 seg, se removió el sobrenadante y se agregó el buffer de lavado (apéndice) a las perlas, este paso se repitió 7 veces. Finalmente, la pastilla de proteína G se resuspendió en 100 μ l de TE y se le agregó 1 μ l de RNAsa, 5 μ l de SDS al 10% y 1 μ l de proteinasa K a 20 mg/ml. Las muestras se incubaron a 55°C por 3 horas y a 65°C toda la noche.

6.11.3. Recuperación del DNA

Las muestras se centrifugaron por 10 seg a máxima velocidad y se recuperó el sobrenadante, al cual le fue añadido un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico, se agitó por 10 seg y se centrifugó a 13,200 rpm a temperatura ambiente por 5 min. La fase acuosa se separó y se trató agregando un volumen de cloroformo y nuevamente se centrifugó a 13,200 rpm a temperatura ambiente por 5 min. La fase acuosa se recuperó y se precipitó añadiendo $1/10$ de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -70°C se dejó por 30 min. La pastilla de DNA obtenida se resuspendió en 20 μ l de H₂O desionizada estéril y se guardó a -20°C hasta su uso.

6.11.4. PCR

Con las muestras de DNA obtenidas se amplificaron los promotores de *sno* y *smad7*. El SBE del promotor de Smad7 se localiza en el nucleótido -210, por lo que se usaron oligonucleótidos que flanquean a esta región. Para *sno* se usaron cebadores que flanquean a la región que contiene a los SBEs. Como control negativo se utilizó a β -actina

como blanco en las reacciones de PCR usando los oligonucleótidos respectivos como se muestran en la Tabla 3.

Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, analizando las bandas correspondientes a los productos de interés.

Blanco	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Tm	Producto esperado
<i>sno</i> ratón	FW	ATAAGGTACCTGGGGCCGAGGGAACAT	26	57	1340 pb
	REV	ATAGAGCTCACGTCCTGGCGGAGACA	27	55	
<i>sno</i> humano	SBEhi	CGCGGTACCGCGGTGAGGGTGGGGTG	26	59	400 pb
	SBEhf	CGCGAGCTCACGTCCTGGCGGAGACA	26	55	
	Snoh FW	CGGCGGGGTACCTGGGGACTAGAGGAAGGAA	31	62	670 pb
	Snoh REV	GGGAGCTCTCGACGAGCTTTGTGAATTCC	30	61	
<i>smad7</i>	S7 sense	CCTCTGCTCGGCTGTTCCAC	21	62	132 pb
	S7 antisense	TAGAAACCCGATCTGTTGTTGCG	24	62	
β -actina	Sense	GGGTCAGAAGGATTCTATG	20	55	237 pb
	Antisense	GGTCTCAACATGATCTGGG	20	55	

Tabla 3. Oligonucleótidos sintéticos utilizados para la reacción de PCR de *sno* y *smad7*. En la tabla se muestran las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para amplificar la región que contiene a los SBEs del promotor del gen *sno* de ratón y humano. Estos pares de oligonucleótidos se diseñaron integrando el sitio de las enzimas de restricción KpnI (azul) y SacI (rosa). En verde se muestran las bases que fueron añadidas con el fin de facilitar el ensamblaje de la Taq polimerasa durante la amplificación del DNA. En la tabla se muestran además las condiciones de Tm de cada reacción. El sitio de reconocimiento de KpnI es GGTACC y de SacI es GAGCTC. Los oligonucleótidos para amplificar a *smad7* sirven para amplificar al promotor *smad7* tanto de ratón como de humano.

La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

PCR ciclos	β -actina	<i>smad7</i>	<i>sno</i> humano
1	5 min - 95°C	5 min - 95°C	5 min - 95°C
30	1 min - 95°C	1 min - 95°C	30 seg - 95°C
	1 min - 55°C	1 min - 65°C	30 seg - 63.5°C

	1 min - 75°C	1 min - 75°C	1 min - 75°C
1	5 min - 75°C	5 min - 75°C	5 min - 75°C
Fin de la reacción	4°C	4°C	4°C

Finalmente, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

6.12. *ChIP en plásmido*

En este ensayo se utilizaron células a las que se les transfectaron transitoriamente los promotores *sno* y *smad7* y el plásmido con el cDNA de TGIF WT. Se utilizaron células AD293 que se crecieron en platos de 100 mm de diámetro hasta alcanzar un 70-75% de confluencia, posteriormente se transfectó 1 µg total de DNA de las construcciones de los promotores con lipofectamina (Invitrogen) y se regresaron las células a la incubadora por 10-48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó el estímulo con TGF-β por 45 minutos, y posteriormente se procedió a realizar el entrecruzamiento de DNA y proteínas con formaldehído y se realizaron las inmunoprecipitaciones, prosiguiendo con el protocolo en forma igual al anterior del ensayo de inmunoprecipitación de cromatina. El DNA resultante fue analizado por medio de reacciones de PCR amplificando con primers específicos para el plásmido pGL3 donde están clonados los promotores. Se utilizaron anticuerpos anti-TGIF y anti-Smad2/3 como control de Santa Cruz Biotechnology, ya mencionados anteriormente. Finalmente, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

7. Resultados

7.1. Bioinformática. Obtención de los sitios de unión a TGIF en las secuencias de los promotores *sno* y *smad7*

Al analizar las secuencias promotoras de ambos genes usando el programa Match – 1.0 Public (Matrix Search for Transcription Factor Binding Sites) se encontraron además de los sitios de unión a las Smads ya caracterizados, sitios de unión a la proteína TGIF, considerando las funciones que le han sido atribuidas a esta proteína, y la capacidad que tiene de regular negativamente a la vía del TGF- β se le podría sugerir un papel como regulador negativo de estos genes (Figura 16 y 17).

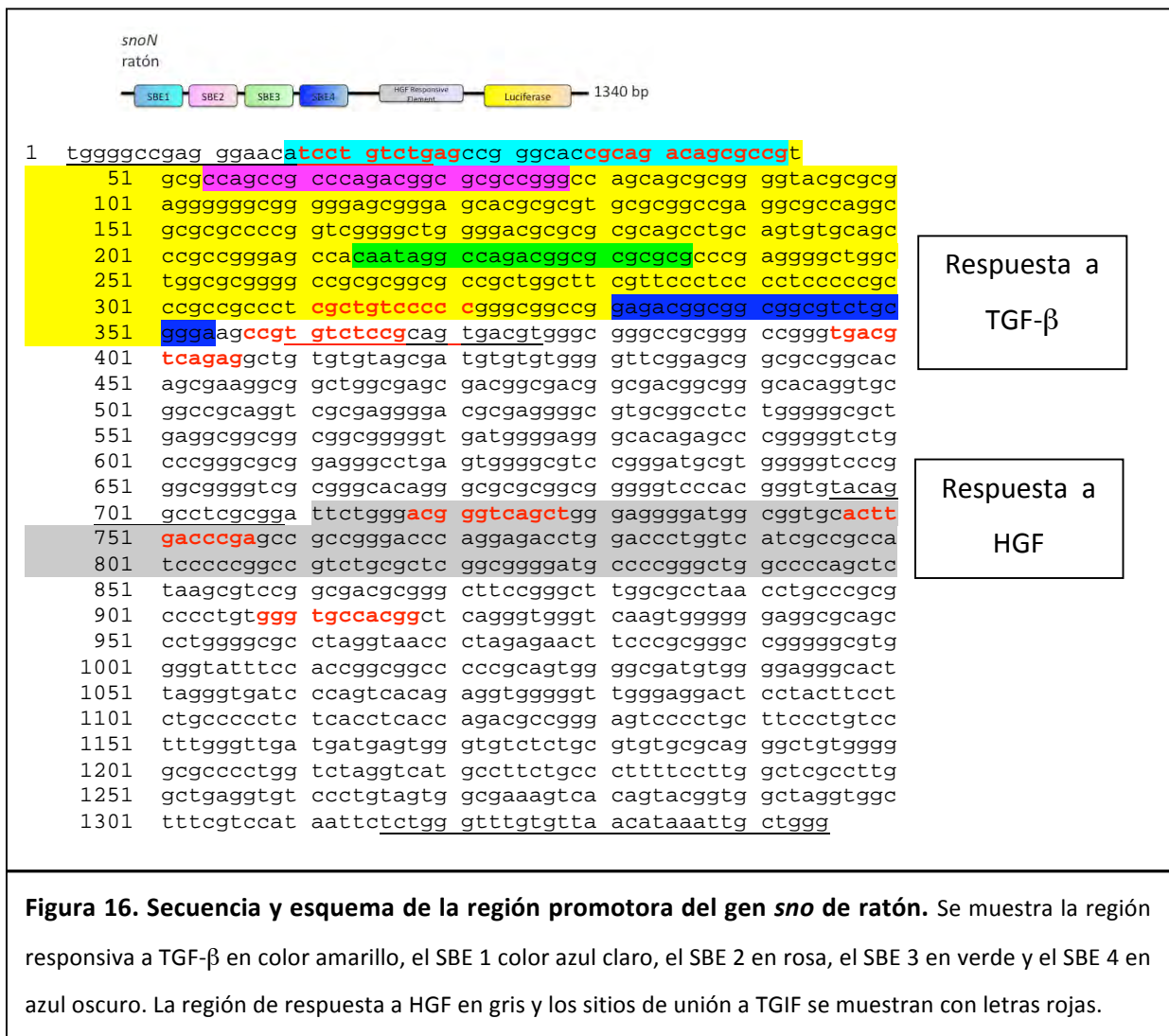
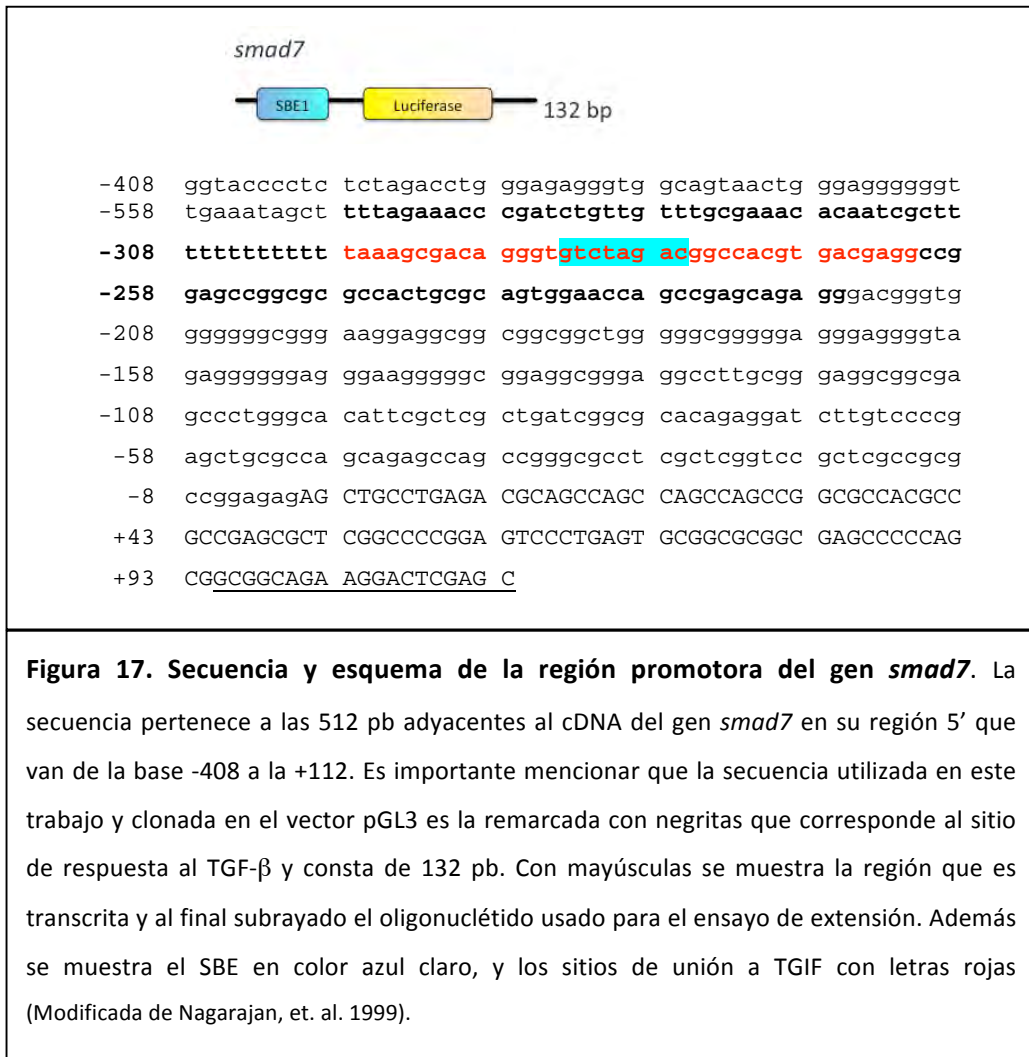


Figura 16. Secuencia y esquema de la región promotora del gen *sno* de ratón. Se muestra la región responsiva a TGF- β en color amarillo, el SBE 1 color azul claro, el SBE 2 en rosa, el SBE 3 en verde y el SBE 4 en azul oscuro. La región de respuesta a HGF en gris y los sitios de unión a TGIF se muestran con letras rojas.



7.2. Efecto de TGF- β sobre la actividad de los promotores de *sno* y *smad7*

Previamente en el laboratorio se demostró que el fragmento del promotor clonado de *sno* humano es inducido por TGF- β (Tecalco-Cruz; 2008). Para comprobar esto y además demostrar lo mismo para *smad7* y para el promotor *sno* de ratón se llevó a cabo la transfección de los plásmidos reporteros descritos previamente en las células AD293 que como se sabe, son responsivas al TGF- β . Se utilizó como control positivo al plásmido 3TPLux . El plásmido 3TPLux es un reportero quimérico que contiene elementos del promotor de colagenasa humana y PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1; Inhibidor del

Activador de Plasminógeno 1) fusionados al gen reportero de luciferasa, este plásmido contiene tres repeticiones de un elemento responsivo a PMA (Phorbol Myristate Acetate; Acetato de Miristato Forbol) llamado 12-O-tetradecanoylphorbol 13 acetato, y además un fragmento del promotor PAI-1 y es por lo tanto, activado por el estímulo del TGF- β en una variedad de células.

Los resultados mostraron que el reportero 3TPLux, empleado como control positivo, responde como se esperaba al TGF- β . Se observa que el tratamiento con TGF- β indujo un aumento de la actividad de luciferasa de aproximadamente 4 veces con respecto al control en las células AD293 (Figura 18). El estímulo de TGF- β es también capaz de activar al promotor de *smad7* (3.5 veces con respecto al control), al promotor *sno* de ratón de 1340 pares de bases (3 veces con respecto al control) y al promotor *sno* de humano de 430 pares de bases (2.5 veces con respecto a su control) esto en las células AD293. Como se observa en la gráfica de la Figura 18 las zonas de los promotores que fueron clonadas y caracterizadas y que contienen a los SBEs tanto de *smad7* como de *sno* de ratón y humano utilizadas para estas transfecciones celulares responden al TGF- β , es decir, al igual que el plásmido 3TPLux, son reguladas positivamente por esta citocina.

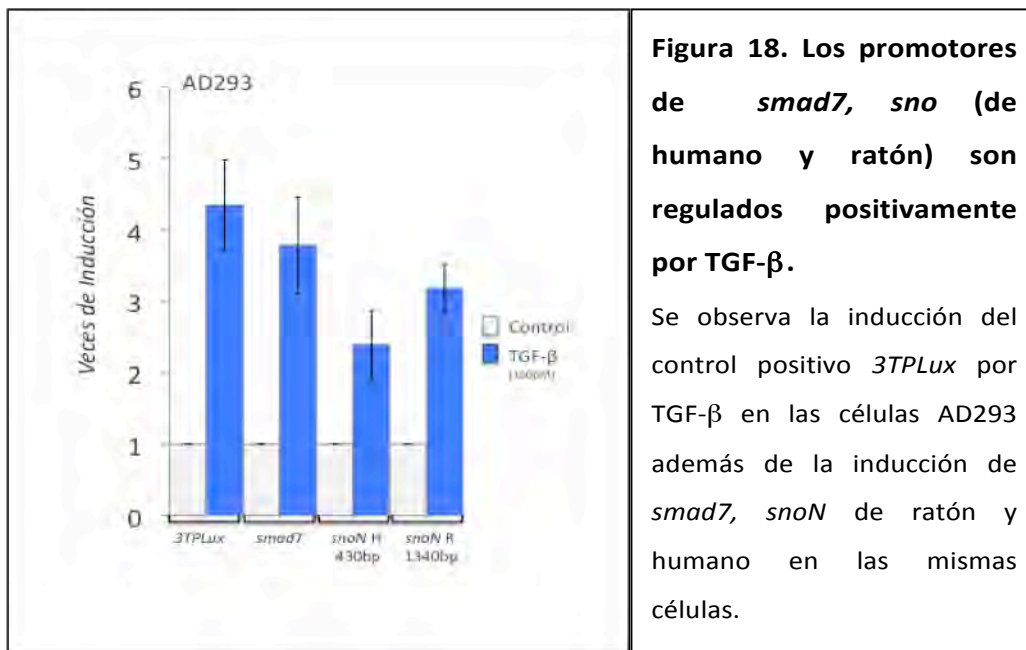


Figura 18. Los promotores de *smad7*, *sno* (de humano y ratón) son regulados positivamente por TGF- β .

Se observa la inducción del control positivo 3TPLux por TGF- β en las células AD293 además de la inducción de *smad7*, *snoN* de ratón y humano en las mismas células.

7.3. Efecto de la sobreexpresión de TGIF sobre los promotores de *sno* y *smad7*

Para establecer el papel que tiene TGIF sobre la regulación de la transcripción de *smad7* y *sno*, las células AD293 se cotransfectaron con el cDNA de la proteína TGIF y los plásmidos ya descritos que tienen el gen de luciferasa bajo el control de estos promotores, usando nuevamente como control al vector 3TPLux. En primera instancia los resultados muestran que tanto 3TPLux como el promotor de los genes *smad7* y *sno* de ratón y humano respondieron al TGF- β ya que el estímulo indujo un aumento en la actividad de luciferasa consistente con lo que ya se había descrito anteriormente. Cuando las células se cotransfectaron con el cDNA de TGIF usado a diferentes concentraciones se observa una inhibición de la actividad de luciferasa a nivel basal y la pérdida de la inducción por TGF- β para el caso del reportero 3TPLux y del promotor del gen *smad7* como se observa en la Figura 19 en las gráficas A y B. Sin embargo, cuando los promotores del gen *sno* tanto de ratón como de humano se cotransfectaron con TGIF se observó un aumento en la actividad de la luciferasa a nivel basal pero se observa un bloqueo en la inducción con TGF- β como se observa en la Figura 19 en las gráficas C y D.

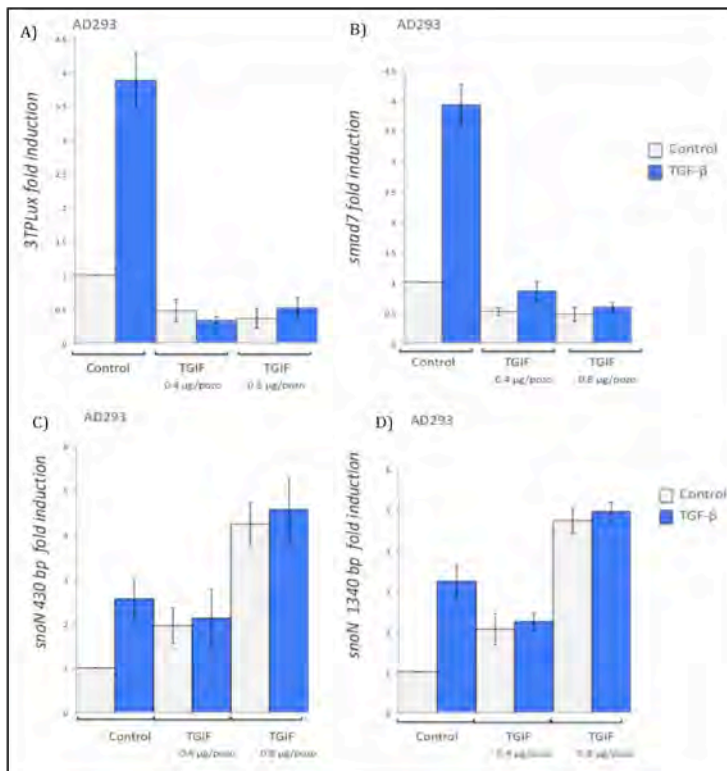
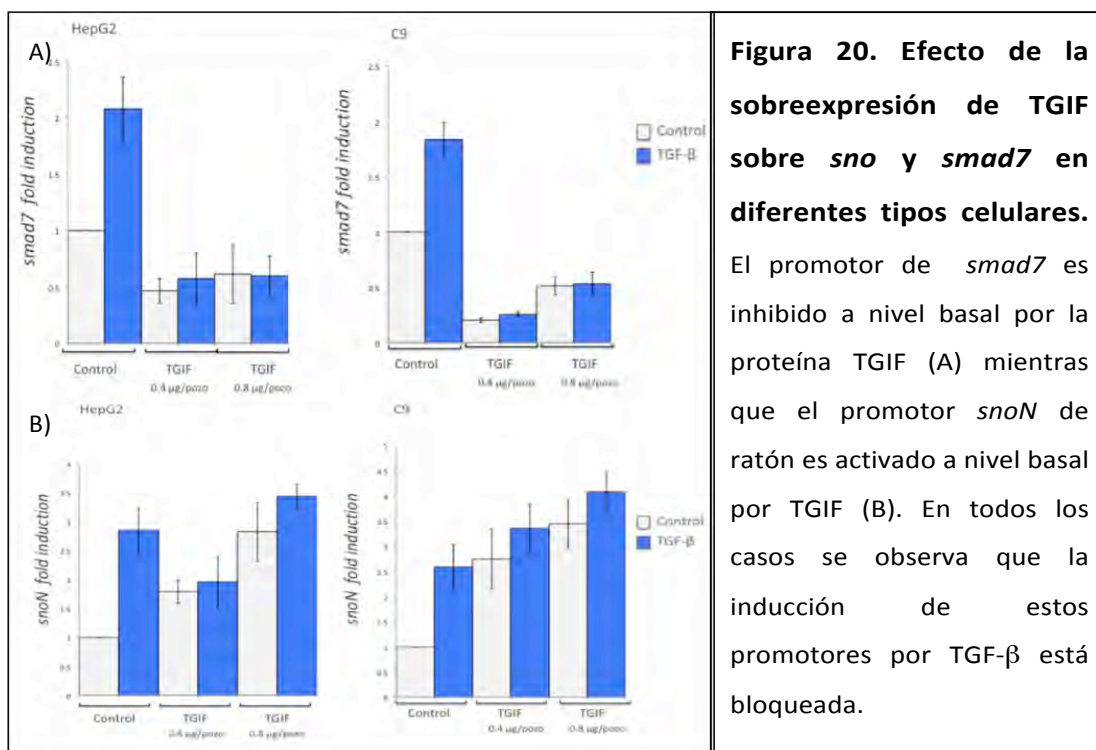


Figura 19. 3TPLux y el promotor de *smad7* son inhibidos a nivel basal por la proteína TGIF (A y B) mientras que los promotores *sno* de humano y ratón son activados a nivel basal por TGIF (C y D). En todos los casos se observa un bloqueo de la inducción de estos promotores por TGF- β .

Para ver si el efecto que tiene TGIF en la regulación de los genes *smad7* y *sno* es dependiente del tipo celular se llevaron a cabo cotransfecciones con el cDNA de TGIF y el promotor de *smad7* o de *sno* de ratón (1340 pb) en diferentes tipos celulares (células HepG2 y las células C9). Como se observa en la Figura 20, el comportamiento es consistente con lo encontrado para las células AD293, el promotor de *smad7* es inhibido a nivel basal y en el contexto del TGF- β tanto en las células HepG2 como en las C9, mientras que el promotor de *sno* de ratón es activado a nivel basal pero su inducción por TGF- β se ve disminuida en la presencia de TGIF, esto ocurre en los tres tipos celulares probados, AD293, HepG2 y C9.



7.4. El efecto de TGIF sobre el promotor de *sno* es dependiente de la dosis

Como ya mostramos, la proteína TGIF es capaz de activar al promotor de *sno*, para esta caracterización se utilizaron dos concentraciones del plásmido que contiene al cDNA de TGIF: 0.4 y 0.8 µg/pozo. Debido a que se encontraron diferencias entre el efecto que

causa una concentración y otra como se observa principalmente en las células AD293, se decidió probar diferentes concentraciones del plásmido. Para esto, las células AD293 se usaron para transfectar al promotor de *sno* de humano de 430 pb y el de ratón de 1340 pb a la par con TGIF a diferentes concentraciones. Como se observa en las gráficas de la Figura 21, el efecto de TGIF sobre el promotor de *sno* es dependiente de la concentración de plásmido transfectada. Al realizar este experimento con el promotor de *smad7* se observó que todas las concentraciones de TGIF usadas reprimieron al promotor. Estos datos se obtuvieron solamente en condiciones basales.

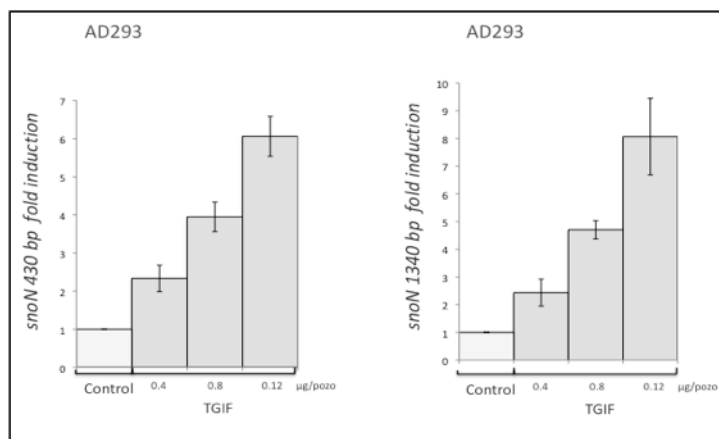


Figura 21. Los promotores de *sno* (de humano y ratón) son activados a nivel basal por TGIF de manera dependiente de la dosis.

7.5. Efecto de las mutantes de TGIF en la regulación transcripcional de *sno* y *smad7*

7.5.1. Evaluación de la sobreexpresión de las mutantes de TGIF

Nuestro primer objetivo fue verificar si las mutantes de TGIF se estaban sobreexpresando correctamente, esto para poder atribuirle los resultados obtenidos a la falta de efecto de la mutante debido a que carece de determinados dominios, más no a la falta de expresión de la misma. Para llevar a cabo estos ensayos de expresión se transfectaron las células AD293 usando lipofectamina con las construcciones TGIF WT o de sus dos mutantes. Al día

siguiente de la transfección se hizo un estímulo con TGF- β por 45 min antes del lisado celular y otro por 2 h para comparar los niveles de expresión de la proteína a diferentes tiempos. Los extractos totales se analizaron por Western Blot usando para la detección un anticuerpo policlonal de conejo Anti-TGIF cuyo epítipo corresponde a los aminoácidos 100 al 272 mapeados en el extremo carboxilo terminal de la proteína TGIF de origen humano (Santa Cruz Biotechnology) y que por lo tanto puede reconocer a TGIF y a las dos mutantes.

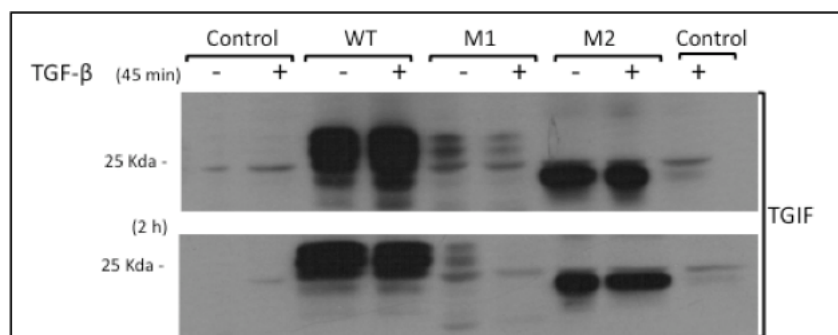


Figura 22. Evaluación de la expresión de TGIF WT y de sus mutantes 1 y 2. Células AD293 fueron transfectadas con las construcciones de TGIF y sus mutantes y tratadas con TGF- β por 45 minutos o 2 horas. Extractos totales de proteínas fueron analizados por

Como se observa en la Figura 23, se logró una sobreexpresión de TGIF WT y de sus mutantes en las células AD293, en primera instancia la expresión de la proteína en su forma silvestre es representada por una banda alrededor de los 30 KDa. En 1999, Wotton reportó que la Mutante 1 da una banda de aproximadamente 25 KDa y la Mutante 2 una banda de aproximadamente 20 KDa. Se realizaron 3 repeticiones y la imagen de la Figura 22 es una imagen representativa de los resultados obtenidos, donde pueden observarse las bandas esperadas, puede observarse además que aparentemente la expresión no sufre cambios importantes después del estímulo con TGF- β ni a 45 minutos ni a las dos horas. Por otro lado, a nivel endógeno mostrado en los carriles de la izquierda de la Figura 22,

parece haber una inducción después del estímulo con TGF- β que es de esperarse pues TGIF es un gen blanco de esta citocina. Es importante resaltar que la expresión de la Mutante 1 es notablemente menor que la de la forma silvestre y la Mutante 2. Aún faltan hacer ensayos de expresión para esta mutante cambiando la cantidad de DNA en la transfección para lograr ver una sobreexpresión clara. Lo que podemos concluir de la Figura 22 es que existe una sobreexpresión de TGIF, tanto de su forma silvestre como de la Mutante 2, además, que la Mutante 1 no se expresa con la misma eficiencia pero que se puede observar la banda que la representa y finalmente, que el TGF- β parece aumentar la expresión de TGIF endógeno pero no tiene efecto aparente en el contexto de sobreexpresión del mismo. Las mutantes se utilizarán en ensayos de genes reporteros para medir el efecto de las mismas sobre la actividad de *sno* y *smad7* en comparación con el efecto que se obtuvo para la proteína TGIF en su forma silvestre.

*7.5.2. Efecto de la sobreexpresión de las mutantes de TGIF sobre la activación de los reporteros de *sno* y *smad7**

Para evaluar el papel de TGIF en la regulación transcripcional de los genes *sno* y *smad7* más a fondo se utilizaron los cDNAs que codifican para dos mutantes de esta proteína para cotransfectarlos en las células AD293 junto con los reporteros de luciferasa que contienen fragmentos de los promotores de estos genes. Recordemos que TGIF es una proteína que tiene 272 aminoácidos. La Mutante 1 (1-148:177-263), carece de los aminoácidos 149 al 176 y de los últimos 10 aminoácidos (262-272) este dominio se ha descrito como un dominio de interacción proteico y por lo tanto, esta mutante pierde su capacidad de interacción con proteínas como las Smad o mSin3 (Wotton, et. al. 1999b; Wotton, et. al. 2001). La Mutante 2 (63-272) carece de los aminoácidos 1 al 62 y por lo tanto carece del dominio de represión ubicado en el extremo amino terminal y además le falta una parte que corresponde a una región del homeodominio y por lo tanto, éste deja de ser funcional por lo que pierde su capacidad de unirse al DNA (Wotton, et. al., 1999). Como control de estas transfecciones se utilizó a la TGIF WT (*wild type*) y además, se probó el efecto de estas mutantes sobre el plásmido 3TPLux.

Como se observa en la gráfica A de la Figura 23 el reportero 3TPLux fue inhibido tanto por la proteína TGIF (como ya se había analizado previamente) como por las 2 mutantes previamente descritas. Esto coincide con los resultados reportados por Wotton en 1999, lo que indica que cualquiera de los dos dominios de la proteína que permanecen en las mutantes llevan a cabo la represión de este reportero. En la gráfica B de la Figura 23 se observa el reportero de luciferasa bajo el control del promotor de *smad7* sometido al efecto de TGIF y de las dos mutantes, como ya se había descrito, la proteína TGIF en su forma silvestre es capaz de reprimir a *smad7* en un estado basal disminuyendo la actividad de luciferasa a aproximadamente la mitad en comparación con el control, este mismo efecto se observó con la Mutante 2, es decir que al quedar el dominio de represión del carboxilo terminal intacto, TGIF pudo reprimir al promotor de *smad7*. Sin embargo, como se observa en la gráfica, la Mutante 1 no fue capaz de reprimir a *smad7* quedando la actividad del reportero igual que su control, esto puede correlacionarse con el gel de la Figura 22 en donde se aprecia que la Mutante 1 no se expresa tanto como las otras dos proteínas, y la falta de efecto puede deberse a esto.

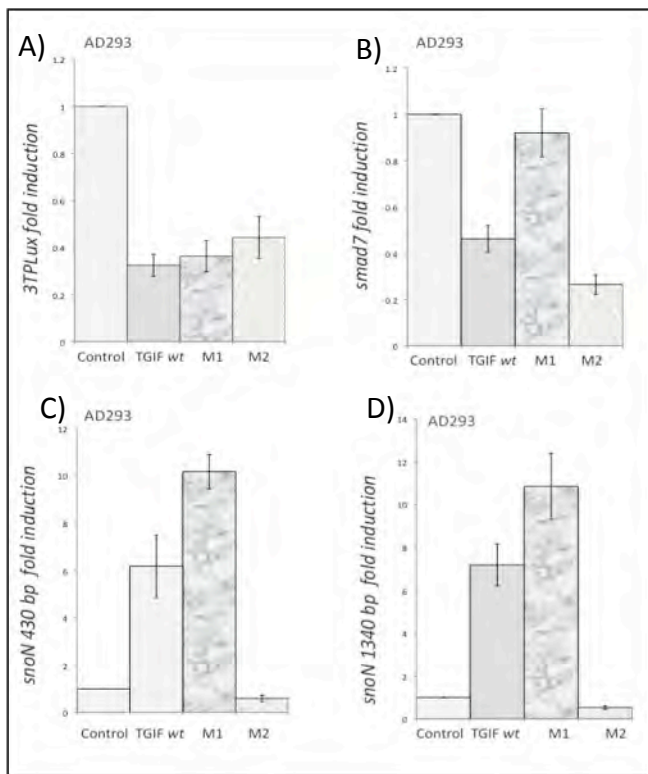
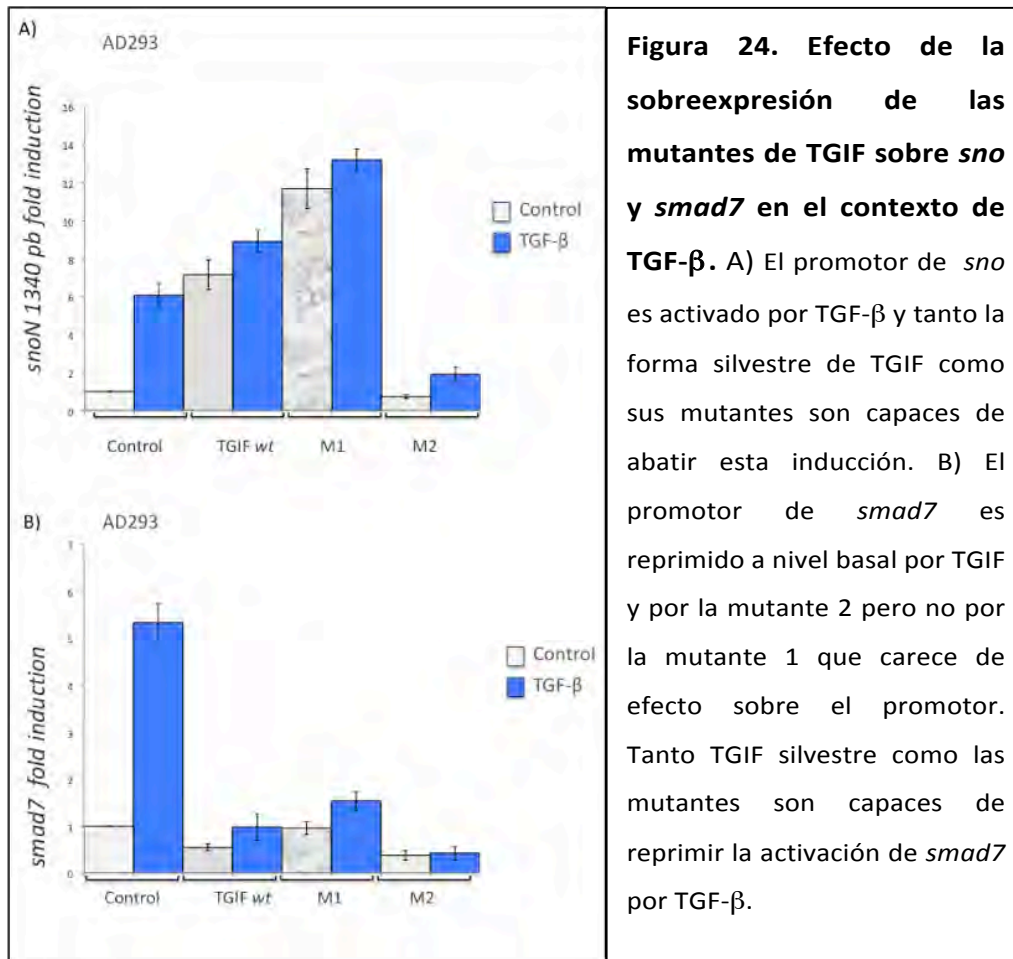


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de las mutantes de TGIF sobre *sno* y *smad7* en las células AD293. El promotor de *smad7* es inhibido a nivel basal por la proteína TGIF (*wild type*) y por la mutante 2, mientras que la mutante 1 no tiene efecto aparente en la actividad del promotor comparado con el control. Los promotores *sno* de ratón y humano son activados a nivel basal por TGIF, la mutante 1 logra un aumento en esta activación mientras que la mutante 2 no logra activar al promotor. Con el plásmido 3TPLux se observa una inhibición de la actividad de luciferasa en todos los casos.

Para el caso de *sno* se confirmó en primera instancia que sus promotores tanto de humano como de ratón son activados por TGIF *wild type* de manera basal, cuando se cotransfecta con la Mutante 1 se puede observar en las gráficas C y D de la Figura 23 que la actividad aumenta, es decir tiene el mismo efecto en el promotor que la proteína silvestre pero el aumento en este caso es de aproximadamente 10 veces con respecto a su control. Interesantemente, cuando se cotransfecta con la Mutante 2 se puede observar que la activación por TGIF se abate y que incluso hay represión a nivel basal cuando se transfecta con esta mutante que carece tanto del dominio de represión amino terminal como de su homeodominio funcional. Es probable entonces que alguno de estos dominios o ambos sean necesarios para que exista una activación por TGIF de los promotores de *sno* tanto de humano como de ratón.

Este ensayo se hizo además agregando el estímulo del TGF- β . Como ya se describió antes, la proteína TGIF en su forma silvestre es capaz de reprimir la inducción de genes provocada por esta citocina. El objetivo de este ensayo fue ver si esta represión se veía afectada al realizar la transfección con las mutantes de TGIF ya descritas (Mutante 1 y 2), utilizando a las células AD293. Como se observa en la Figura 24 en la gráfica A el promotor de *sno* de ratón es activado a nivel basal por TGIF en su forma silvestre y por la Mutante 1 de TGIF, sin embargo esta activación se pierde cuando se transfecta con la Mutante 2. Al estimular con TGF- β la actividad del promotor aumenta de manera basal mientras que cuando se cotransfecta tanto con TGIF *wt* como con cualquiera de las mutantes esta inducción abate totalmente. Por lo que se puede inferir que TGIF puede utilizar diferentes mecanismos para evitar que el promotor de *sno* se active por TGF- β y, además, se corrobora que su activación a nivel basal es dependiente de su dominio amino terminal.

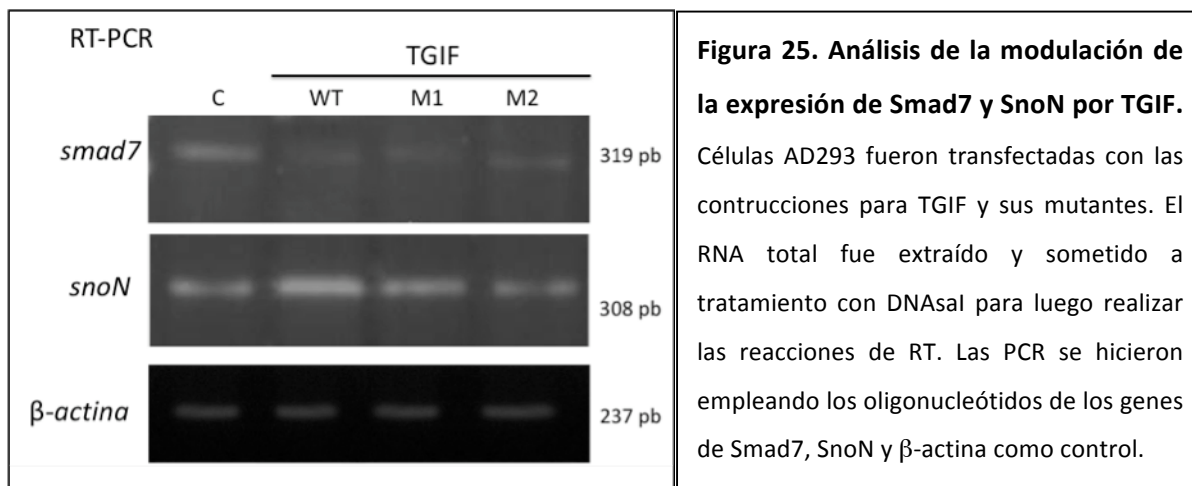
Por otro lado, como se muestra en la gráfica B de la Figura 24 el promotor de *smad7* es activado por el estímulo de TGF- β a nivel basal y es inhibido a nivel basal por TGIF en su forma silvestre que también impide su activación por TGF- β , este comportamiento se repite cuando se cotransfecta con cualquiera de las dos mutantes.



7.5.3 Efecto de las mutantes de TGIF sobre los niveles de RNAm de *smad7* y *sno*

Se realizaron además ensayos de RT-PCR para analizar el efecto de TGIF y sus mutantes sobre la expresión del RNAm de *Smad7* y *SnoN*. Para llevar a cabo estos ensayos se transfectaron células AD293 con los plásmidos codificantes para TGIF WT y sus mutantes y se obtuvo el RNA total mediante una extracción con Trizol como se detalla en materiales y métodos. El RNA total de cada muestra fue tratado con DNAsal antes de proceder a la transcripción reversa. Los análisis de RT-PCR se muestran en la Figura 25, como se puede observar, la presencia de TGIF reprime la expresión del mensajero de *Smad7* comparando con el control, al igual que las dos mutantes. Mientras que para el caso de *SnoN*, TGIF en su forma silvestre induce la expresión del gen sobre su control, también la Mutante 1 es

capaz de inducir a SnoN pero en mejor cantidad, y, por último la Mutante 2 de TGIF no fue capaz de activar al gen de SnoN. Los datos nos sugieren que TGIF además de reprimir a Smad7 por diferentes mecanismos puede activar la transcripción del gen de SnoN en su forma silvestre y aparentemente esta activación es dependiente del HD pues la Mutante 2 que carece de estos dominios no pudo activar al gen.



7.6. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para entender cómo está regulada la expresión del fragmento que responde a TGF- β de los promotores de los genes *sno* y *smad7* se hicieron ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el fin de analizar la unión de TGIF a los promotores de *sno* y *smad7*, utilizando a las células C9, HepG2, y AD293 estimuladas con TGF- β 0.5 nM por 45 minutos e inmunoprecipitando a Smad2/3, TGIF, y a la β -Actina que fue usada como control negativo. Posteriormente, la cromatina recuperada de cada ensayo se empleó en las reacciones de PCR amplificando a la región que flanquea al elemento SBE localizado en el promotor de *smad7* y, a la región que flanquea a los SBEs localizados en el promotor de *sno* como ya se describió en materiales y métodos. En la Figura 26 observamos los productos obtenidos después de hacer las reacciones de PCR.

Para el caso de la cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo Smad2/3 observamos que, luego del tratamiento con TGF- β se observa un aumento en la intensidad de la banda el cual nos indica que hay complejos de smads activos unidos a los sitios SBEs de ambos promotores a los 45 minutos después del estímulo, este resultado fue usado como control de la técnica y correlaciona con lo antes reportado por Briones-Orta, et. al., en el año 2006. Fue importante además establecer un control negativo, y para esto se utilizó como blanco en la reacción de inmunoprecipitación a la β -actina, que no fue amplificada en las reacciones de PCR como se muestra en la Figura 26.

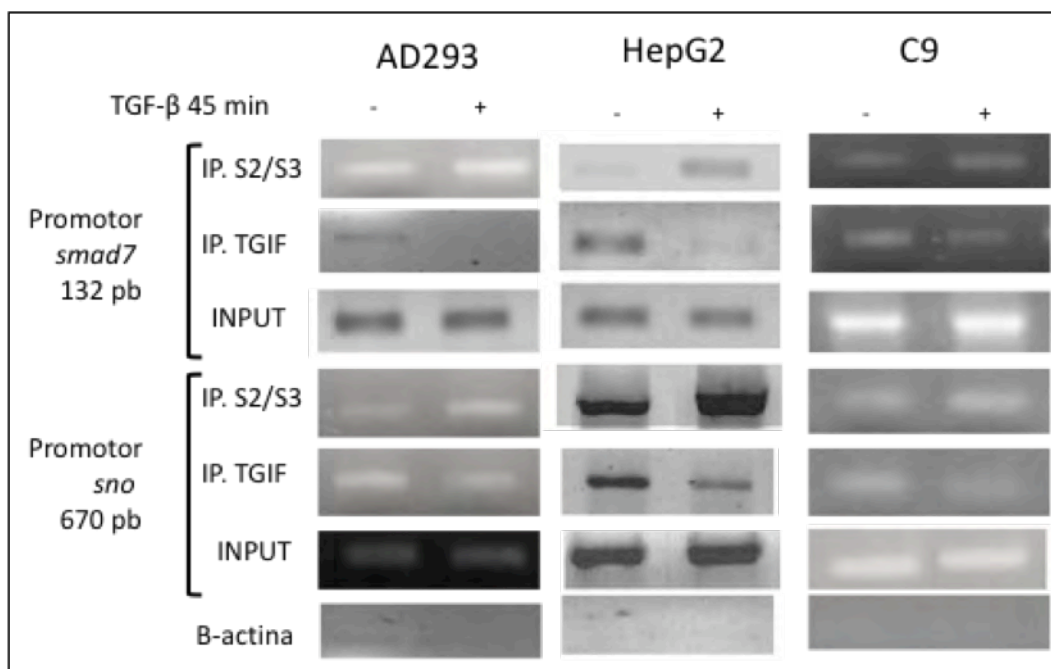


Figura 26. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). La proteína TGIF se une a los promotores de *sno* y *smad7* en células en estado basal (esta unión puede ser directa o indirecta), luego del estímulo con TGF- β se observa una disminución de TGIF en el promotor al tiempo que se observa un reclutamiento del complejo Smad2/Smad3 activado en respuesta al estímulo con la citocina.

Al analizar los resultados de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-TGIF, se observa que en el control aparece un producto de PCR que nos indica que de manera

endógena TGIF está asociado a los promotores de *smad7* y *sno* (aunque no se sabe si es una unión directa o indirecta al DNA) en sus sitios SBEs. Sin embargo, tras el tratamiento con TGF- β por 45 minutos se observa una disminución notable del producto de PCR lo que indica una disociación de TGIF en los dos promotores. En la misma figura se observan los controles de la cromatina “input” o controles de entrada que confirman que en las inmunoprecipitaciones se empleó la misma cantidad de material. Estos resultados en conjunto indican que el estímulo de TGF- β es capaz de promover el reclutamiento de Smad2/3 al sitio SBE de los promotores *sno* y *smad7*, como sabemos que ocurre por la activación de las R-Smads, además, lleva a una disociación de TGIF pues estos complejos activos pueden competir por el sitio de unión en el DNA pues el sitio de unión a TGIF y el sitio SBE están cerca e incluso en el promotor de *smad7* se sobrelapan. En las células HepG2, AD293 y C9 se obtuvieron los mismos resultados como se observa en la Figura 26.

7.7. Resultados preliminares

ChIP en plásmido

Debido a que el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina anterior se realizó en condiciones endógenas, se realizó además un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina donde se sobreexpresó tanto el promotor ya sea de *sno* o de *smad7* como TGIF WT (ChIP en plásmido). Como se observa en la imagen del ChIP endógeno de la Figura 26, hay una disminución del posicionamiento en ambos promotores de la proteína de TGIF endógena y hay un aumento de los complejos activados Smad2/3 tras el estímulo con TGF- β . Resultado que concuerda con el obtenido para el control mostrado del lado izquierdo de la Figura 27 en el cual se observa un aumento de los complejos Smad2/3 en el promotor tras el estímulo con la citocina cuando TGIF no está sobreexpresado. Sin embargo, cuando se sobreexpresa a TGIF no se observa un aumento en el posicionamiento de Smad2/3 sobre el promotor en respuesta a TGF- β , lo cual correlaciona con los datos obtenidos en los ensayos con reporteros, pues vimos a nivel basal hay una activación de ambos promotores tras el estímulo con TGF- β , pero cuando TGIF está

sobreexpresado se observó que hay un bloqueo de la inducción por TGF- β de ambos promotores.

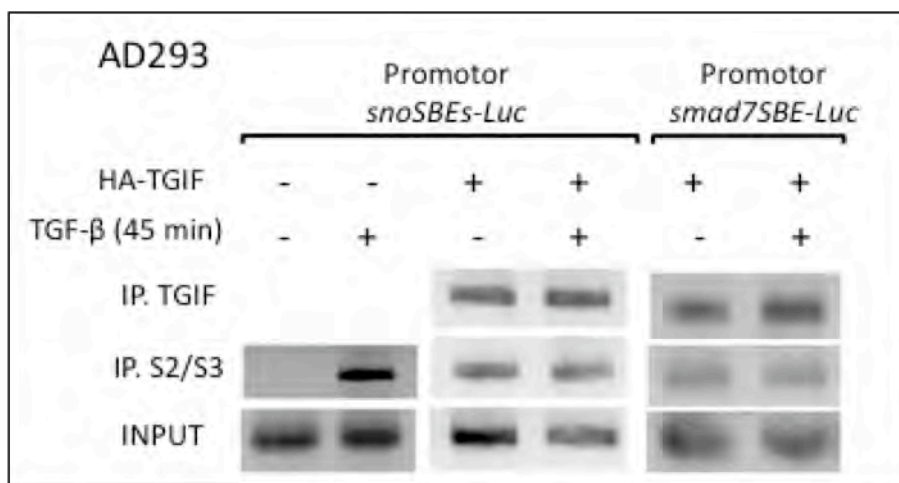


Figura 27. Inmunoprecipitación de cromatina en plásmido (ChIP en plásmido). La sobreexpresión de la proteína TGIF WT impide el posicionamiento de los complejos Smad2/Smad3 activados en respuesta al estímulo con TGF- β , como se observa que ocurre en el control, tanto en el promotor de *sno* como en el de *smad7*.

8. Discusión

En trabajos previos realizados en el laboratorio se demostró que los genes *sno* y *smad7* son genes blanco del TGF- β pues la expresión del RNAm de estos genes es regulada positivamente por esta citocina en distintos tipos celulares (Briones-Orta, 2006; Vázquez-Macías, 2006). La señal del TGF- β es a su vez controlada por los productos de estos genes, es decir, las proteínas SnoN y Smad7 son represores de la vía formando una asa de retroalimentación negativa que le da fin a la señal (Vázquez-Macías et. al., 2005; Briones-Orta, et. al., 2006). Los promotores de los genes *sno* y *smad7* fueron previamente clonados en el laboratorio con el objetivo de analizar su regulación a fondo (Tecalco-Cruz, 2008). Esto ha sido importante para entender los patrones de expresión de SnoN y Smad7, sobre todo por los distintos procesos en donde se ha visto implicada la participación de estas proteínas, como por ejemplo, se ha visto que SnoN participa en la tumorigénesis y en procesos de metástasis (Zhu, et. al., 2006), así como Smad7, cuyos niveles son bajos en células epiteliales normales, sufre una elevación en diferentes tipos de cáncer (Kleeff, 1999). Por otro lado, se ha descrito que correpresores como SnoN y Ski son capaces de regular a nivel transcripcional a los genes blanco del TGF- β , *smad7* y *sno*. La proteína TGIF, una proteína con homeodominio perteneciente a la familia TALE, que es también una proteína blanco del TGF- β , es capaz de regular la señal de esta citocina en forma negativa (Wotton, et. al., 1999) de ahí parte nuestro interés por ver si este correpresor de la vía de las Smads es capaz de modular a los genes *sno* y *smad7* y qué implicaciones tiene esta regulación en el contexto del TGF- β .

8.1. Análisis bioinformático. El sitio de unión a TGIF se encontró en los promotores de *sno* y *smad7*

La región con los elementos de interés que son regulados por las proteínas Smads fue delimitada en la secuencia promotora de *sno* y *smad7*. Análisis previos del promotor de *sno* muestran que hay cuatro zonas de respuesta a TGF- β conservadas en ratón y humano que coinciden con la secuencia previamente reportada de unión a las proteínas Smads

(Domínguez-Hüttinger, 2008; Tecalco-Cruz, 2008). En el promotor de *smad7* se encontró un SBE que regula la respuesta al estímulo con TGF- β y también es una secuencia altamente conservada (Nagarajan, et. al., 1999). La secuencia a la que la proteína TGIF se une en el DNA fue reportada por Bertolino y cols. en 1995, inicialmente, se estableció como GCTGTCAC, sin embargo, después de diversos estudios se ha establecido que basta con las bases TGTCa para que TGIF se una al DNA por medio de su homeodominio (Yang, et. al. 2000). Con ayuda del programa Match-1.0-Public se definieron los posibles factores de transcripción que pudieran estar regulando la expresión de estos dos genes. En el promotor de *sno* humano de 430 pares de bases se encontraron 4 sitios de unión a TGIF, los primeros dos se encuentran sobrelapados con la secuencia del SBE1, el tercero se encuentra entre los SBEs 3 y 4 y el último después del cuarto SBE. El promotor *sno* de ratón de 1340 pares de bases tiene además de los 4 sitios ya mencionados 4 sitios de unión a TGIF adicionales, dos de los cuales se encuentran sobrelapados a la secuencia del elemento de respuesta a HGF. En el promotor de *smad7* se encontraron tres secuencias de unión a TGIF, dos de las cuales se sobrelapan con la secuencia SBE de este promotor (Figura 16 y 17). En primera instancia, el haber encontrado posibles sitios de unión a TGIF en los promotores *sno* y *smad7*, puede contribuir a nuestra hipótesis inicial de que TGIF podría estar participando en la regulación transcripcional de estos genes, y que posiblemente lo haga mediante la unión al ADN por medio de su homeodominio. Es importante resaltar el hecho de que algunos de estos sitios de unión a TGIF y los sitios de unión a las proteínas Smad en ambos promotores se sobrelapan ya que esto puede ser el indicio de un pronóstico de TGIF como regulador negativo de estos genes en el contexto del TGF- β pues, al estar tan cerca estos sitios puede haber un impedimento estérico de TGIF con respecto al complejo Smad activo que necesita unirse al promotor para que se lleve a cabo la transcripción, es posible entonces que TGIF participe en conjunto con las Smads para regular la expresión de estos genes dependiendo entre otras cosas, del tipo celular.

8.2. Los promotores *sno* y *smad7* son modulados por TGF- β

Para demostrar la regulación de los promotores *sno* y *smad7* por TGF- β , se clonaron previamente en el laboratorio los fragmentos de ambos promotores que contienen a los SBEs de ratón y de humano en el vector pGL3-Basic (Tecalco-Cruz, 2008). Se usó como control al plásmido 3TPLux que presenta 3 repeticiones de la secuencia de unión a Smads correspondientes al promotor de *PAI-1*, un gen responsivo al TGF- β . Las células AD293, sirvieron para realizar el análisis de los genes reporteros pues al ser derivadas de las HEK293 han sido establecidas como células que responden al TGF- β y como modelo celular con funcionales pues pueden transfectarse eficientemente por métodos como el de fosfato de calcio o por lipofectamina. Los resultados (Figura 18) muestran que los promotores de *sno*, *smad7* así como el reportero 3TPLux se inducen tras el estímulo con TGF- β como se esperaba por ser responsivos a esta citocina. Es decir, la zona que contiene a los SBEs de los promotores de *sno* y *smad7* clonados en el vector pGL3-Basic responden a la citocina. La mayor inducción se obtuvo con el reportero 3TPLux siendo de 4.5 veces sobre su control, seguida de la inducción del promotor de *smad7* siendo de 4 veces sobre el control. Sin embargo, la inducción máxima obtenida para el promotor de *sno* de 430 pb fue de 2.5 veces sobre su control en los contextos estudiados, lo que sugiere un mecanismo más complejo en su regulación en donde dependiendo de los complejos formados por las proteínas Smads, la presencia de correpresores de la vía del TGF- β como SnoN, Ski, TGIF o incluso la presencia de factores de transcripción específicos de cada tejido pudieran estar implicados en su regulación. Al usar el promotor de 1340 pb de ratón se obtuvo una inducción de aproximadamente 3.5 veces sobre su control, la diferencia entre estos dos promotores sugiere la importancia que tiene el uso del promotor completo de *sno* pues otros elementos pudieran estar implicados en la regulación de la expresión de este gen. Aunado a esto, es posible que los niveles de TGIF o de proteínas como Ski o SnoN propios de cada contexto celular pueden influir en la respuesta de estos genes en forma basal o en el contexto del TGF- β .

8.3 TGIF modula la represión del promotor de *smad7* y la activación del promotor de *sno* a nivel basal

Para evaluar el papel de TGIF en la regulación transcripcional de *smad7* y *sno* se hicieron cotransfecciones de estos promotores con el cDNA de TGIF clonado en el vector pCMV5 el cual se usó a diferentes concentraciones (0.4 y 0.8 µg/pozo).

En el análisis inicial, en las células AD293 se observó que la presencia de TGIF inhibe la actividad del reportero de luciferasa bajo el control del promotor de ***smad7*** disminuyéndola aproximadamente a la mitad, esto a nivel basal, resultado que es consistente con lo observado para el reportero 3TPLux (Figura 19) y consistente también con lo reportado por Wotton en 1999 para 3TPLux y para A3-Lux, en donde se observa que TGIF es capaz de inducir una represión a nivel basal de la expresión de estos genes. Se repitió el mismo ensayo en las células C9 y HepG2 donde se obtuvieron los mismos resultados, lo que indica que la capacidad de TGIF de reprimir a *smad7* puede darse en diferentes contextos celulares. Del ensayo de luciferasa donde se cotransfectó el correpresor TGIF con el reportero de luciferasa bajo el control del promotor ***sno*** se obtuvo uno de los datos más interesantes pues contrasta con lo que se esperaba de la participación de TGIF en la regulación transcripcional de este gen y contrastante además con la literatura existente para esta proteína hasta el momento. Como se observa en la Figura 19 la actividad basal de *sno* se incrementa con presencia de TGIF, la concentración menor usada (0.4 µg/pozo) aumenta esta actividad al doble mientras que la concentración mayor (0.8 µg/pozo) induce un aumento basal de aproximadamente 4 veces sobre el control. Hasta el momento no se ha reportado que TGIF pueda interactuar con proteínas de la maquinaria basal de transcripción, sin embargo, a pesar de que a TGIF se le ha atribuido la función de correpresor transcripcional 'obligado', no se puede descartar la capacidad de TGIF de activar la transcripción pues puede unirse directamente al DNA o bien puede ser reclutado al DNA por medio del complejo de proteínas Smads activadas y, como describió Wotton en 1999, TGIF podría estar interactuando con alguna proteína específica que enmascare su habilidad de reprimir la transcripción. Es posible entonces que en el caso del promotor de *sno*, TGIF esté funcionando como estabilizador de la unión

de una proteína activadora que hasta el momento no ha sido identificada al DNA y así induzca la activación de este gen. Otro mecanismo que se puede proponer es que alguna proteína o un complejo de proteínas se encuentren bloqueando de manera basal la activación de *sno* y TGIF al estar sobreexpresado induzca la disociación de esta proteína del promotor por medio de una asociación con este complejo y así se active la transcripción del gen *sno* hacen falta estudios de los complejos asociados al promotor de *sno* y a TGIF de manera basal para poder dilucidar este mecanismo de regulación. Es importante mencionar además que se encontró que la activación a nivel basal de este gen es dosis-dependiente, como se muestra en la Figura 21, lo cual nos indica la importancia de la dinámica en la cantidad de proteína disponible ya sea TGIF o complejos Smads, en un contexto celular determinado. Y es importante señalar además la regulación diferencial a nivel basal que se encontró para estos dos genes estudiados, donde es muy probable que participen además otros factores específicos determinando la respuesta final de la regulación a nivel transcripcional de estos genes dependiendo del contexto celular.

*8.4. TGIF reprime la activación por TGF- β de *sno* y *smad7**

El efecto inhibitorio de TGIF sobre la vía de señalización del TGF- β se ha observado en experimentos donde la sobreexpresión de esta proteína es capaz de inhibir el efecto transactivatorio de las Smads sobre genes reporteros que responden al TGF- β . Ya sea al reclutar directamente a complejos HDACs sobre Smad2 o bien estabilizando la unión de Smad2 con una ligasa E3 de ubiquitina que manda de esta manera a Smad2 a degradación (Wotton 1999, 1999b). En las Figuras 19 y 20 se observa que tras el estímulo con TGF- β los promotores *sno* y *smad7* y el reportero 3TPLux se inducen a nivel basal por esta citocina como se discutió anteriormente, sin embargo, cuando TGIF está presente este efecto de inducción por TGF- β se observa abatido. Este resultado era de esperarse pues ha sido establecido que TGIF es capaz de reprimir la transcripción activada por TGF- β dependiente de Smad2/Smad3 por medio de sus dominios amino y carboxilo terminal. Hasta el momento entonces podemos concluir que TGIF puede tener dos papeles separados en una célula, uno actuando como correpressor de la vía del TGF- β activada por

las Smads, es decir limitando el efecto final de esta vía y el otro, reprimiendo o activando (como observamos con *smad7* y *sno* respectivamente) la transcripción de genes. Y, por tanto, la represión o activación de cualquier gen por TGIF no necesariamente tiene que tener una redundancia funcional con su papel en la transcripción activada por TGF- β (Chen, 2003; Wotton, 1999).

8.5. Las mutantes de TGIF. Mecanismo de regulación transcripcional de *sno* y *smad7*.

Para lograr establecer el mecanismo por el cual TGIF regula a los genes *sno* y *smad7* o bien tener una idea inicial de cual de los dominios de la proteína puede ser necesario para que la regulación ya establecida se lleve a cabo y así inferir el mecanismo por el que TGIF regula a estos genes se hicieron transfecciones transitorias con las mutantes de TGIF. Primero se verificó mediante un inmunoblot la sobreexpresión de estas proteínas, como se observa en la Figura 22, la sobreexpresión de TGIF WT y de la Mutante 2 se observan adecuadamente, sin embargo, la Mutante 1 no se expresó con la misma eficiencia. Este resultado es consistente con lo reportado por David Wotton en 1999 en donde encuentra una baja eficiencia en la expresión de la mutante 1 carente del dominio de interacción con las proteínas Smad, en este estudio se reportó además que ambas mutantes son capaces de reprimir la expresión del gen *PAI-1* lo que es consistente con los resultados mostrados en la Figura 23, ya que se obtuvo que las 3 proteínas fueron capaces de reprimir de manera basal al plásmido 3TPLux, en esta misma figura se observa que tanto la proteína silvestre como la mutante 2 inhiben al promotor de *smad7*, sin embargo la mutante 1 no tiene efecto en este ensayo con reporteros, resultado que se puede atribuir a la expresión disminuida de esta mutante. En cuanto al promotor de *sno* se obtuvo que la mutante 1 tiene el mismo efecto que la proteína TGIF WT, lo que puede interpretarse como una falta de efecto de la misma en línea con lo obtenido para *smad7*, cuando se sobreexpresó a la Mutante 2 no se observa activación de este promotor a nivel basal, puede establecerse entonces una dependencia de la activación a su capacidad de unión de TGIF con el DNA, como ya se había argumentado previamente es posible que la unión de TGIF al DNA propicie la unión de alguna otra proteína que active la transcripción de este gen. En

cuanto a la inducción de ambos genes provocada específicamente por el estímulo del TGF- β se observó una represión total en todos los casos, como ya se había visto, TGIF es capaz de reprimir la señalización por TGF- β mediante diferentes mecanismos, en los que puede participar su dominio de unión al DNA, su dominio RD-1 o el RD-2. Además del estudio con reporteros se evaluó el efecto de las mutantes de TGIF por medio de ensayos de RT-PCR (Figura 25), como se observa, tanto TGIF WT como la Mutante 2 reducen los niveles de mensajero de *smad7*, y se observa que también la Mutante 1 tiene este efecto sobre el RNAm, aunque esta mutante se exprese menos que las demás se aprecian cambios en los niveles de mensajero con las 3 proteínas de TGIF. Para el promotor *sno* se obtuvo un dato importante, la proteína TGIF WT provoca un aumento en los niveles de mensajero de *sno*, podemos observar el mismo efecto con la Mutante 1 pero no con la Mutante 2, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos con los reporteros que indican que la Mutante 2 no activa a *sno* de manera basal.

8.6. TGIF es reclutado a los promotores de *sno* y *smad7* y se disocia en respuesta al TGF- β .

Con la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se evaluó en primera instancia el reclutamiento de las proteínas endógenas Smad2/3 a los promotores de *sno* y *smad7*. Esto se efectuó en 3 tipos celulares distintos responsivos a TGF- β . Como se observa en la Figura 26, el reclutamiento de Smad2/3 al promotor de *sno* y *smad7* ocurre después del estímulo de 45 min con TGF- β , se observa el posicionamiento de estas proteínas en el promotor en respuesta a esta citocina. Cuando se inmunoprecipitó contra TGIF se observa un resultado opuesto al de Smad2/3, es decir, primero se observa posicionado en ambos promotores de manera endógena y tras el estímulo con TGF- β se da una disociación de TGIF de ambos promotores. Es posible que, debido a la cercanía que tienen los sitios de unión a las Smads (SBEs) con los sitios de unión a TGIF en ambos promotores, la activación de las Smads las lleve a competir por el DNA y provoque una competencia por los sitios y por ende un impedimento estérico que provoque la disociación de TGIF. Con relación a lo descrito, podría especularse que el complejo activo de Smads funciona de forma orquestada en conjunto con TGIF. Además TGIF puede depender de la presencia o

ausencia de otros factores para integrarse y formar complejos que regulen a su vez la expresión o represión de *smad7* y *sno*.

8.7. La sobreexpresión de TGIF impide el posicionamiento de Smad2/3 sobre los promotores de sno y smad7 en respuesta al TGF- β .

Como se observa en la Figura 27, en el control el reclutamiento de Smad2/3 al promotor de *sno* y *smad7* ocurre después del estímulo de 45 min con TGF- β , observamos el posicionamiento de estas proteínas en el promotor en respuesta a esta citocina, esto correlaciona con el ensayo con reporteros inicial de la Figura 18 en el vemos que los dos promotores se activan por TGF- β de manera basal, sin sobreexpresar a TGIF, es decir que tanto en estos ensayos como en el control de este CHIP TGIF se encuentra en niveles endógenos y la activación por TGF- β no se ve afectada. Sin embargo, cuando se sobreexpresa a TGIF como se observa en la parte derecha de la Figura 27, se observa que no hay un aumento del posicionamiento de Smad2/3 en los dos promotores y por lo tanto tampoco hay una activación por TGF- β de estos genes. Estos resultados no explican el incremento basal de *sno* pero pueden explicar el efecto negativo que tiene TGIF sobre la expresión de ambos genes blanco al impedir de alguna forma el posicionamiento de los complejos Smad activados sobre ambos promotores, probablemente al asociarse directamente con estos complejos, sería importante realizar este ensayo de CHIP en plásmido con las diferentes mutantes de TGIF particularmente con la Mutante que no se puede unir a las Smads pues podría esperarse que la sobreexpresión de esta mutante pudiera no afectar el posicionamiento de las proteínas Smad2/3 sobre los promotores en respuesta a TGF- β . Podemos concluir entonces que cuando se sobreexpresa TGIF se bloquea la inducción por TGF- β de estos promotores, como ya se observó también con los ensayos con reporteros.

9. Conclusiones

De manera general, este trabajo muestra por primera vez la participación de TGIF en la regulación de dos genes blanco del TGF- β . Este estudio apunta a que los genes *sno* y *smad7* pueden ser modelos útiles para ilustrar la red de interacciones a nivel molecular que existe entre los componentes de la vía. De manera particular:

- ⇒ Se definieron las secuencias responsivas al TGF- β de los promotores *sno* y *smad7*. Mediante ensayos con reporteros se comprobó que el TGF- β provoca una activación transcripcional de estos dos genes.
- ⇒ Se estableció una regulación diferencial de los genes *sno* y *smad7* por el correpresor transcripcional TGIF, de manera particular se observó que TGIF es capaz de reprimir a nivel basal al gen *smad7* mientras que causa una activación a nivel basal del gen *sno* tanto de ratón como de humano, lo que es independiente del contexto celular pues se obtuvieron resultados similares en distintos tipos celulares como células C9, HepG2 y AD293. Puede concluirse además que la activación basal de *sno* por TGIF es dosis dependiente.
- ⇒ La proteína TGIF inhibe la activación por TGF- β mediada por las Smads de *sno* y *smad7*. Esto es de manera independiente del contexto celular y puede darse por medio de los diferentes dominios funcionales de TGIF pues en el caso de *smad7* ambas mutantes reprimieron la señal del TGF- β .
- ⇒ Se estableció además que TGIF está unido a los dos promotores de manera endógena y a nivel basal, pues tras el estímulo con TGF- β por 45 minutos surge una disociación de la proteína, esto sucede en distintos tipos celulares. Y cuando se sobreexpresó esta proteína impide el posicionamiento del complejo Smad2/3 y por tanto participa en el bloqueo de la activación de estos genes por TGF- β como se observó en los ensayos con reporteros y en el CHIP en plásmido.

Este trabajo presenta un modelo de la regulación de los genes *sno* y *smad7* por el correpresor transcripcional TGIF, como se muestra en la Figura 28, en condiciones **endógenas** TGIF está posicionado en ambos promotores pero se disocia tras el estímulo con TGF- β para permitir la asociación del complejo Smad2/3 y la transcripción

de ambos genes en respuesta a la citocina. Sin embargo, como se observa en la Figura 29, cuando TGIF se sobreexpresa se observa, a nivel basal, una activación del gen *sno*, esto puede ser porque TGIF permita la asociación con alguna proteína activadora o bien porque pueda estar desplazando a alguna proteína represora que se encuentra posicionada en el promotor de manera basal. De manera contraria, la sobreexpresión de TGIF produce una represión de *smad7*. En el contexto del TGF- β , nuestros datos apuntan a que TGIF impide el posicionamiento de las proteínas Smad sobre los dos promotores y por ende bloquea su activación por esta citocina.

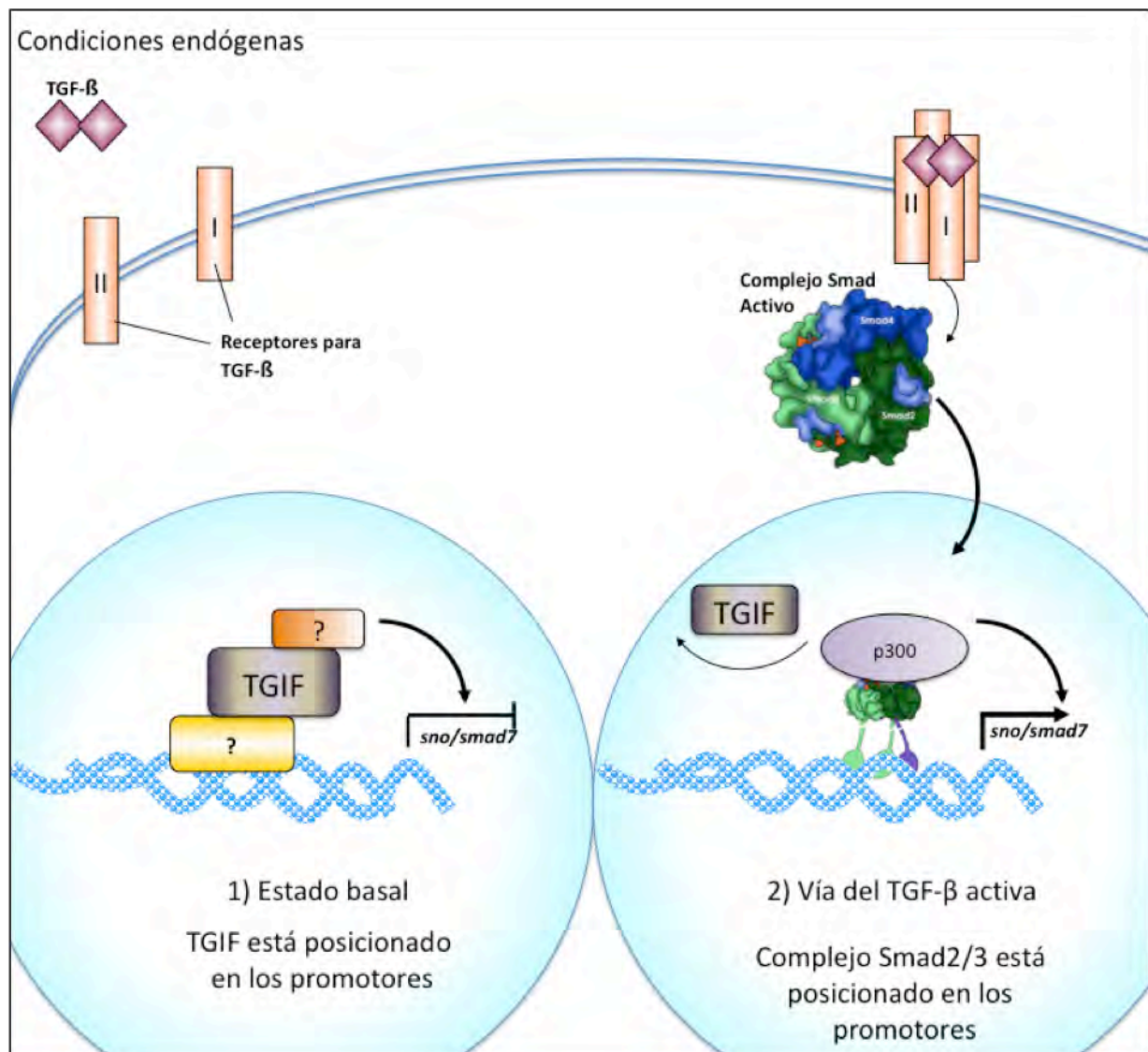


Figura 28. Modelo de la regulación de *sno* y *smad7* en condiciones endógenas. TGIF está posicionado en ambos promotores en estado basal y se disocia tras el estímulo con TGF- β al mismo tiempo que se posiciona el complejo Smad2/3 sobre los dos promotores para que los dos genes puedan transcribirse en respuesta a la citocina.

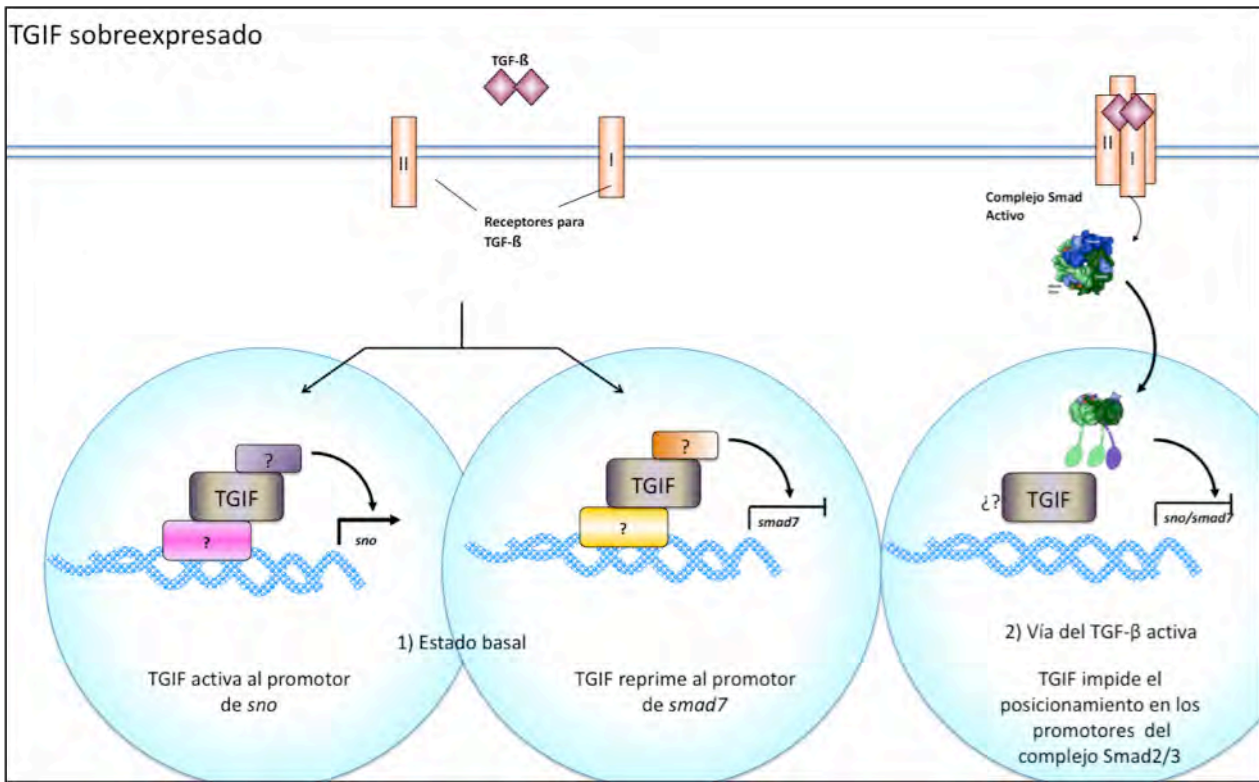


Figura 29. Modelo de la regulación de *sno* y *smad7* cuando TGIF está sobreexpresado. La sobreexpresión de la proteína TGIF WT produce una activación de *sno* y una represión de *smad7* en condiciones basales, además impide el posicionamiento de los complejos Smad2/Smad3 activados en respuesta al estímulo con TGF-β y por lo tanto se bloquea la inducción por esta citocina de ambos genes.

Este estudio también apunta a que los genes *smad7* y *sno*, al ser regulados diferencialmente por este correpresor puedan funcionar como un modelo útil para dilucidar la compleja red de interacciones moleculares que regulan la vía del TGF-β. La estricta regulación que presentan estos genes nos muestra la importancia de la vía del TGF-β en la regulación de distintos aspectos celulares, y por ende, la importancia de los factores que la regulan y que son regulados por la misma.

10. Perspectivas

Tomando como antecedente a los resultados obtenidos en este trabajo se pueden hacer estudios posteriores, enfocados a profundizar en el mecanismo de regulación que está empleando la célula para regular la expresión de las proteínas SnoN y Smad7. De manera particular, establecer a fondo el mecanismo por el que TGIF participa en la regulación directa de estos genes o bien, en el contexto del TGF- β . Para ello es interesante cubrir algunos puntos importantes:

- ⇒ Determinar el mecanismo de unión de TGIF a los promotores de *sno* y *smad7*. Estudiar si TGIF se une a sus secuencias de unión al DNA aledañas a los SBEs de los promotores o bien si se une a través de otras proteínas como por ejemplo las proteínas Smad. Esto se podría realizar usando geles de retardo, usando como sonda las secuencias de unión a TGIF, extractos nucleares y anticuerpos contra TGIF. Los extractos pueden realizarse en las células AD293 pues se ha detectado TGIF a niveles endógenos.
- ⇒ Tomando en cuenta los modelos propuestos de los mecanismos de regulación para *sno* y *smad7*, es importante profundizar en cada uno de ellos, por ejemplo describir el mecanismo por el cual *sno* está siendo activado por el correpressor transcripcional TGIF, si es mediante la asociación con una proteína activadora o bien si está quitando alguna proteína o complejo de proteínas que se encuentren reprimiendo a este gen de manera basal. Para cumplir este objetivo se pueden realizar estudios de interacción proteína-proteína.
- ⇒ Observar el comportamiento tanto de *sno* como de *smad7* al quitar a TGIF de manera endógena. Esto podría hacerse al expresar de manera estable un RNA que impida la expresión de esta proteína y mediante ensayos con reporteros de luciferasa o bien mediante inmunoblots observar el efecto de la ausencia de TGIF a nivel transcripcional y de expresión protéica. De igual manera podría efectuarse un ensayo con microarreglos comparando a células cuya expresión de TGIF sea normal con células que no expresen esta proteína y así poder identificar genes blanco del TGF- β que se vean afectados por esta condición experimental.
- ⇒ Siguiendo el punto anterior, es importante entonces determinar en otros genes responsivos a TGF- β el papel regulador de TGIF. En este caso se podrían estudiar

genes que se sabe que son regulados positivamente por esta citocina y ubicarlos como candidatos a una regulación por TGIF ya sea positiva o negativa a nivel basal y negativa en el contexto del TGF- β .

⇒ De manera más específica para este trabajo podrían hacerse estudios para establecer la importancia de proteínas remodeladoras de cromatina como las HDACs en la regulación de la expresión de *smad7*, esto teniendo en cuenta el antecedente de que TGIF tiene la capacidad de reclutar a estas proteínas a diversos genes blanco para así reprimir su expresión.

⇒ Probar el efecto de TGIF en otros contextos además del contexto del TGF- β , como esto se podría llevar a cabo haciendo ensayos con reporteros de luciferasa y usando a HGF, o EGF como estímulo para estas células que ya se observó que influyen en la función y estabilidad de la proteína TGIF.

11. Apéndice

Para extracción de proteínas y Western Blot

TN 10 X

Para preparar 100 ml

		Concentración Final
50 ml	Tris 1 M	0.5 M
30 ml	NaCl 5 M	1.5 M
20 ml	H ₂ O	

Buffer TNTE 0.5 %

Para preparar 100 ml

		Concentración Final
10 ml	TN 10 X	50 mM
200 µl	EDTA 0.5 M (pH 8.0)	1 mM
5 ml	Tritón 10%	0.5 %
85 ml	H ₂ O	

Buffer TNTE 0.1 %

Para preparar 100 ml

		Concentración Final
10 ml	TN 10 X	50 mM
200 µl	EDTA 0.5 M (pH 8.0)	1 mM
1 ml	Tritón 10%	0.1 %
89 ml	H ₂ O	

Inhibidores de fosfatasa

Para 1 ml	Solución Stock	Disolvente	Concentración Final
-----------	----------------	------------	---------------------

10 µl	Na VO ₄ (100 mM)	H ₂ O	1 mM
10 µl	NaPPi (100 mM)	H ₂ O + HCl 8 mM	1 mM
25 µl	NaF (1 M)	H ₂ O	25 mM

Inhibidores de proteasas

Para 1 ml	Solución Stock	Disolvente	Concentración Final
5 µl	PMSF (1 M)	Isopropanol	0.1 mM
2 µl	β-glicerofosfato (0.5 M)	TE (pH 7.4)	1 mM
2 µl	Benzamidina (50 mg/ml)	TE (pH 7.4)	100 µg/ml
2 µl	Inhibidor de tripsina (50 mg/ml)	TE (pH 7.4)	100 µg/ml
2 µl	Antipaina (5 mg/ml)	TE (pH 7.4)	10 µg/ml
2 µl	Aprotinina (5 mg/ml)	DMSO	10 µg/ml
2 µl	Pepstatina A (5 mg/ml)	DMSO	10 µg/ml
2 µl	Leupeptina (5 mg/ml)	TE (pH 7.4)	10 µg/ml

Para inmunoprecipitación de cromatina

Solución de Formaldehído 11%

Para preparar 5 ml

		Concentración Final
1.5 ml	37% Formaldehyde (Merk/EM)	11%
100 µl	NaCl 5 M	0.1 M
10 µl	EDTA 0.5 M (pH 8.0)	1 mM
10 µl	EGTA 0.25 M (pH 8.0)	0.5 mM
250 µl	Hepes 1 M (pH 8.0)	50 mM
3.1 ml	H ₂ O	

Para extracción de núcleos

Buffer de Lisis (Buffer 1)

Para preparar 100 ml

	Concentración Final

5 ml	Hepes-KOH 1 M (pH 7.4)	50 mM
2.8 ml	NaCl 5 M	140 mM
200 µl	EDTA 0.5 M (pH 8.0)	1 mM
10 ml	Glicerol	10%
5 ml	NP-40 10%	0.5 %
0.25 ml	Tritón X-100	0.25%

Buffer 2

Para preparar 100 ml

		Concentración Final
4 ml	NaCl 5 M	200 mM
0.2 ml	EDTA 0.5 M (pH 8.0)	1 mM
0.1 ml	EGTA 0.5 M (pH 8.0)	0.5 mM
0.5 ml	Tris-HCl 2 M (pH 8.0)	10 mM

Buffer 3

Para preparar 100 ml

		Concentración Final
0.2 ml	EDTA 0.5 M (pH 8.0)	1 mM
0.1 ml	EGTA 0.5 M (pH 8.0)	0.5 mM
0.5 ml	Tris-HCl 2 M (pH 8.0)	10 mM

**Es necesario añadir los inhibidores de proteasas que se señalan a continuación a los 3 buffers al momento de utilizarlos.*

Mezcla de inhibidores de proteasas

Añadir a las concentraciones finales que se señalan:

Aprotinina 0.1 µg/ml (preparar solución Stock a 5 mg/ml en H₂O, guardar a -20°C)

Leupeptina 0.1 µg/ml (preparar solución Stock a 5 mg/ml en H₂O, guardar a -20°C)

Glicina 2.5 M

Para preparar 2 ml, disolver 375 mg en H₂O.

Bloqueo de la proteína G

Se bloquean 500 µl de proteína G con 30 µl de DNA de esperma de salmón a 10 mg/ml (Promega) y 15 µl de albúmina sérica bovina a 20 mg/ml, mezclando durante toda la noche. Al siguiente día la proteína G se lava centrifugando a 3000 rpm por 2 min, desechando el sobrenadante y repitiendo este proceso 2 veces más. Al final la proteína G bloqueada se resuspende en TE 1:1 (vol/vol), se guarda a 4°C hasta el momento de utilizarse.

Buffer de Inmunoprecipitación

Para cada inmunoprecipitación

		Concentración Final
195 µl	TE	1 mM
50 µl	Tritón X-100	1%
5 µl	Deoxicolato de sodio (prepararlo fresco)	0.1%

**Es necesario añadir los inhibidores de proteasas antes mencionados al momento de utilizar.*

Buffer de Lavado RIPA

1 X	Concentración Final
Tris-HCl pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1%
Na ₂ EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Deoxicolato de sodio	1%
SDS	0.1%

Pirofosfato de sodio	2.5 mM
β -Glicerofosfato	1 mM
Na_3VO_4	1 mM
Leupeptina	1 $\mu\text{g/ml}$

12. Referencias

- Afrakhte M., et. al. (1998) Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- β family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 2, 505-511.
- Akiyoshi S., Ishii M., Nemoto N., Kawabata M., Aburatani H., Miyazono K. (2001) Targets of Transcriptional Regulation by Transforming Growth Factor- β : Expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Japanese Journal of Cancer Research.* 92, 257-268.
- Alberts, et. al., (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4ta edición.
- Bannister, J. A., Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature.* 384, 641-643.
- Bartholin L., et. al. (2006) TGIF inhibits Retinoid Signaling. *Molecular and Cellular Biology.* 26, 3, 990-1001.
- Bartholin L., et. al. (2008) Maternal Tgif is required for vascularization of the embryonic placenta. *Developmental Biology.* 319, 285-297.
- Bertolino E., Reimund B., Wildt-Perinic D., Clerc R. G. (1995) A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a Retinoid-responsive Motif. *The Journal of Biological Chemistry.* 270, 52, 31178-31188.
- Briones-Orta M. A. (2006) Regulación de la expresión de Smad7 por el correpressor SnoN. *Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México*, Dirigida por: Dra. Marina Macías Silva.
- Briones-Orta M. A., Sosa-Garrocho M., Moreno-Álvarez P., Fonseca-Sánchez M. A., Macías-Silva M. (2006) SnoN co-repressor binds and represses *smad7* gene promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 341, 889-894.
- Chen C. P., et. al. (2002) Molecular diagnosis of a novel heterozygous 268C \rightarrow T (R90C) mutation in *TGIF* gene in a fetus with holoprosencephaly and premaxillary agenesis. *Prenat Diagn.* 22,5-7.
- Chen F., et. al. (2003) Regulation of TG-interacting factor by Transforming Growth Factor- β . *Biochem. J.* 371, 257-263.

- Chen X., et. al. (1997) Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature*. 389, 6646, 85-89.
- Cui W., Akhurst R. J. (1996) Transforming Growth Factor β s: biochemistry and biological activities in vitro and in vivo. *Growth Factors and Cytokines in Health and Disease*. Vol. 1B, 319-356.
- Dai C., Liu Y. (2004) Hepatocyte Growth Factor antagonizes the profibrotic action of TGF- β 1 in mesangial cell by stabilizing Smad Transcriptional Corepressor TGIF. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 1402-1412.
- Denissova N. G., et. al. (2000) Transforming Growth Factor- β -inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 12, 6397-6402.
- Denissova N. G., Liu F. (2004) Repression of endogenous Smad7 by Ski. *J. Biol. Chem.* 279, 27, 28143-28148.
- Domínguez-Hüttinger E. (2008) Análisis bioinformático del promotor de Sno de homo sapiens y mus musculus. *Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México*, Dirigida por: Dra. Marina Macías Silva.
- Dong C., Zhu S., Wang T., Yoon W., Li Z., Alvarez R. J., ten Dijke P., White B., Wigley F. M., Goldschmidt-Clermont P. J. (2002) Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 6, 3908-3913.
- Dooley S., Hamzavi J., Breitkopf K., Wiercinska E., Said H. M., Lorenzen J., ten Dijke P., Gressner A. M. (2003) Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology*. 125, 1, 178-191.
- Feng, X. H., et. al. (1998) The tumor supressor Smad4/DPC4 and transcripcional adaptor CBP/p300 are coactivators for Smad3 in TGF- β -induced transcripcional activation. *Genes Dev.*, 12, 2153-2163.
- Fukushima D., et. al. (1993) Localization os Transforming Growth Factor-Beta binding site in betaglycan. Comparison with small extracellular matrix proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 268, 30, 22710-22715.
- Gripp K. W., Wotton D., Edwards M. C., Roessler E., Ades L., Meinecke P., Richieri-Costa A., Zackai E. H., Massague J., Muenke M., Elledge S. J. (2000)

Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet.* 25, 205–208.

- Gomperts B. D., Kramer I. M., Tatham P. E. R. (2009) Signal Transduction. Segunda Edición, *Academic Press*.
- Halder S. K., Beauchamp R. D., Datta P. K. (2005) Smad7 induces tumorigenicity by blocking TGF- β -induced growth inhibition and apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 307, 1, 231-246.
- Hamid R., Patterson J., Brandt S. J. (2008) Genomic structure, alternative splicing and expression of *TG-interacting factor*, in human mieloide leucemia blasts and cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779, 347-355.
- Hanai J., et. al. (1999) Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J. Biol. Chem.* 274, 44, 31577-31582.
- Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y. Y., Grinell B. W., Richardson M. A., Topper J. N., Gimbrone M. A. Jr., Wrana J. L., Falb D. (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of TGF- β signalling. *Cell.* 89, 7, 1165-1173.
- Hua X., et. al. (1999) Specificity in transforming growth factor-beta-induced transcripción of the plasminógeno activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3 and Smad proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 23, 13130-13135.
- Hua X., et. al. (2000) Synergism between transcription factors TFE3 and Smad3 in Transforming Growth Factor- β -induced transcription of the Smad7 gene. *J. Biol. Chem.* 275, 43, 33205-33208.
- Izzi L., Attisano L. (2004) Regulation of the TGF- β signaling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene.* 23, 2071-2078.
- Javelaud D., Mauviel A. (2004) Mammalian Transforming Growth Factor-Betas: Smad signaling and Physio-pathological roles. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36, 1161-1165. *Review.*
- Jonk L. J., Itoh S., Heldin C. H., ten Dijke P., Kruijer W. (1998) Identification and fuctional characterization of Smad Binding Element (SBE) in the JunB promoter

that acts as a transforming growth factor- β , activin and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J. Biol. Chem.* 273, 33, 21145-21152.

- Kleeff J., et. al. (1999) The TGF- β signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity and pancreatic cancer. *Oncogene.* 18, 39, 5363-5372.
- Kuang C., et. al. (2006) In vivo disruption of TGF- β signaling by Smad7 leads to premalignant ductal lesions in the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 6, 1858-1863.
- Labbe E., et. al. (1998) Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF-beta-dependent transcripción through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol. Cell.* 2, 1, 109-120.
- Lewin B. (2004) *Genes VIII.* 8va edición. 837-838.
- Lin Y. C., Stavnezer J. (1992) Regulation of transcripción of the germ-line Ig α constant region gene by an ATF element and by novel transforming growth factor- β 1-responsive elements. *J. Immunol.* 149, 2914-2925.
- Liu X., et. al., (2001) Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 12, 1-8.
- Liu X., Lee J., Cooley M., Bhogte E., Hartley S., Glick A. (2003) Smad7 but not Smad6 cooperates with oncogenic ras to cause malignant conversion in a mouse model for squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 63, 22, 7760-7768.
- Lo R. S., Wotton D., Massagué J. (2001) Epidermal Growth factor signaling via Ras controls the Smad transcripcional co-repressor TGIF. *The EMBO Journal.* 20, 15 (1&2) 128-135.
- Luo K. (2004) Ski and SnoN: negative regulators of TGF- β signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.,* 14, 65-70.
- Luo K., et. al. (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF- β signaling. *Genes Dev.,* 13, 2196-2206.
- Macías-Silva M., Abdollah S., Hoodless P., Pirone R., Attisano L., Wrana J. (1996) MADR2 is a substrate of the TGF- β Receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signalling. *Cell.* 87,7,1215-1224.
- Mar L., Hoodless P. A. (2006) Embryonic Fibroblasts from Mice Lacking *Tgif* were defective in Cell Cycling. *Molecular and Cellular Biology.* Vol. 26. No. 11, 4302-4310.

- Massagué J. (1990) The Transforming Growth Factor- β Family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 597-641.
- Massagué J. (1998) TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
- Massagué J., Gomis R.R. (2006) The logic of TGF- β signaling. *FEBS Lett.* 22, 2811-2820. *Review.*
- Massagué J., Wotton D. (2000) Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *The Embo Journal.* Vol. 19 No. 8, 1745-1754.
- Maurice D., et. al. (2001) Loss of Smad4 function in pancreatic tumors: C-terminal truncation leads to decreased stability. *J. Biol. Chem.* 276, 43175-43181.
- Melhuish T., et. al.. (2001) TGIF2 interacts with Histone Deacetylase 1 and represses transcription. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 276 No. 34, 32109-32114.
- Miyazono K., et. al. (1994) Receptors for Transforming Growth Factor- β . *Advan. Immunol.* 55, 181-220.
- Monteleone G., et. al. (2001) Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 108, 4, 601-609.
- Nagarajan R. P., Zhang J., Li W., Chen Y. (1999) Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J. Biol. Chem.* 274, 47, 33412-33418.
- Nakao A., Afrakhte M., Moren A., Nakayama T., Christian J. L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N. E., Heldin C. H., ten Dijke P. (1997) Identification of Smad7, a TGF- β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature.* 389, 6651, 631-635.
- Nakao A., et. al. (1999) Transient gene transfer and expresión of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 104, 1, 5-11.
- Nakao A., Okumura K., Ogawa H. (2002) Smad7: a new key player in TGF-beta-associated disease. *Trends. Mol. Med.* 8, 8, 361-363.
- Nanni L., et. al. (1999) The mutational spectrum of the *Sonic hedgehog* gene in holoprosencephaly: *SHH* mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2479-2488.

- Nanni L., et. al. (2000) Holoprosencephaly: molecular study of a California population, *Am. J. Med. Genet.* 90, 315:319.
- Pearson-White S., Crittenden R. (1997) Proto-oncogene Sno expression, alternative isoforms and immediate early serum response. *Nucleic Acids Res.* 25, 2930-2937.
- Pessah M., et. al. (2001) c-Jun interacts with the corepressor TG-interacting factor (TGIF) to supress Smad2 transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (11): 6198-203.
- Rouyun Tn., Zhang X., Yang J., Liu Y., Li Y. (2007) Molecular basis for the cell type-specific induction of SnoN expression by Hepatocyte Growth Factor. *Journal of the American Society of Nephrology.* 18, 2340-2349.
- Seoane J., et. al. (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell.* 113, 6, 685-700.
- Siegel P. M., Massagué J. (2003) Cystostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 807-821. Review.
- Stroschein S. L., et. al. (1999) Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science,* 286, 771-774.
- Suzuki H., et. al. (2004) c-Ski inhibits the TGF- β signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene.* 23, 5068-5076.
- Tecalco-Cruz A. C. (2008) Clonación y análisis del promotor del oncogen *snoN* humano. *Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México,* Dirigida por: Dra. Marina Macías Silva.
- Ueki N., Hayman M. J. (2003) Direct interaction of Ski with either Smad3 or Smad4 is necessary and sufficient for Ski-mediated repression of TGF- β signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 24858-24864.
- Vázquez-Macías A. (2006) La degradación de Ski y SnoN por anisomicina modula la señalización del TGF- β . *Tesis de Doctorado, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN,* Dirigida por: Dra. Marina Macías Silva.

- Vázquez-Macías A., Ruíz-Mendoza A. B., Fonseca-Sánchez M. A., Briones-Orta M. A., Macías-Silva M. (2005) Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin. *FEBS. Lett.* 4, 579 (17), 3701-3706.
- Wakefield L., Roberts A. (2002) TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 22-29.
- Wang D., Kanuma T., Mizumuma H., Ibuki Y., Takenoshita S. (2000) Mutation analysis of the Smad6 and Smad7 gene in human ovarian cancers. *Int. J. Oncol.* 17, 6, 1087-1091.
- Wotton D., et. al. (1999) A Smad Transcriptional Corepressor. *Cell*, Vol. 97, 29-39.
- Wotton D., et. al. (1999)b Multiple Modes of Repression by the Smad Transcriptional Corepressor TGIF. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, No. 52, 37105-37110.
- Wotton D., et. al. (2001) The Smad Transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth & Differentiation*. Vol. 12, 457-463.
- Wrana J. L., et. al. (1992). TGF-beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71 (6), 1003–1014.
- Wrana J. L., Attisano L., Wieser R., Ventura F., Massagué J. (1994) Mechanism of activation of the TGF- β Receptor. *Nature*. 370, 341-347.
- Wu J. W., et. al. (2002) Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF- β signaling. *Cell*. 111, 357-367.
- Yang Y., et. al. (2000) Three-amino acid Extension Loop Homeodomain proteins Meis2 and TGIF differentially regulate transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, 27, 20734-20741.
- Yang S., Nugent M. A., Panchenko M. P. (2008) EGF antagonizes TGF- β induced tropoelastin expression in lung fibroblasts via stabilization of Smad corepressor TGIF. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* 295, L143-L151.
- Yingling J., et. al. (2004) Development of TGF- β signaling inhibitors of cancer therapy. *Nature*. 3, 1011-1022.
- Zhang Y., Feng X. H., Derynck R. (1998) Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcripción. *Nature*. 394, 6696, 909-913.

- Zhu H. J., Burgess A. W. (2001) Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 4(6), 321-330. Review.
- Zhu Q., Pearson-White S., Luo K. (2005) Requirement for the SnoN oncoprotein in Transforming Growth Factor- β -induced oncogenic transformation of fibroblast cells. *Molecular and Cellular Biology.* 25, 24, 10731-10744.
- Zhu Q., Krakowski D., Wang L., Bandyopadhyay A., Berdeaux R., Martin S. G., Sun L., Luo K. (2006) Dual role of SnoN in mammalian tumorigenesis. *MCB doi.* 10. 1128, 1394-06.